Aus dem Pathologischen Institut der Freien Universität Berlin
im Städtischen Krankenhaus Westend
Direktor: Professor Dr. med. Wilhelm Maßhoff

ÜBER DAS VERHALTEN DER GRUNDSUBSTANZ NACH UNTERSUCHUNGEN AM TALKUMGRANULOMBEUTEL

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

1965

vorgelegt von
Kurt Günter Ravens
aus Frauendorf/Kr. Randow

Aus dem Pathologischen Institut der Freien Universität Berlin
im Städtischen Krankenhaus Westend
Direktor: Professor Dr. med. Wilhelm Maßhoff

ÜBER DAS VERHALTEN DER GRUNDSUBSTANZ NACH UNTERSUCHUNGEN AM TALKUMGRANULOMBEUTEL

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Kurt-Günter Ravens
aus Frauendorf/Kr. Randow

Dekan: Professor Dr. med. Wilhelm Maßhoff

Referent: Professor Dr. med. Wilhelm Maßhoff

Korreferent: Professor Dr. med. Karlferdinand Kloos

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 19. November 1965

Gliederung:

A. Einleitung

1. Über die Grundsubstanz

a) Historisches und Definition der Grundsubstanz
b) Chemische Zusammensetzung der Grundsubstanz
c) Grundsubstanz und Zelle als physiologische Einheit

2. Ziel der Arbeit
I. Dynamik der Grundsubstanzbildung
II. Modifikation der Reaktionen

3. Kritische Einführung in die Probleme der gesetzten Ziele

B. Eigene Untersuchungen

1. Methode
2. Befunde

I. Fragestellung
a) normale Mäusehaut
b) Talkumgranulombeutel
α) makroskopisch
β) histologisch
γ) histochemisch

c) Talkumgranulom
α) makroskopisch
β) histologisch
γ) histochemisch

d) Paraffingranulom
α) makroskopisch
β) histologisch
γ) histochemisch

II. Fragestellung

a) Vorversuche
b) Versuche mit ß - APN
α) makroskopisch
β) histologisch
γ) histochemisch

c) Versuche mit ß - APN·HCL
α) makroskopisch
β) histologisch
γ) histochemisch

C. Besprechung

1. zur I. Fragestellung
2. zur II. Fragestellung

D. Zusammenfassung

E. Literatur

A. Einleitung

Ungefähr seit Beginn des 19. Jahrhunderts wird das Material, in welches die Zellen des Organismus eingebettet sind, als "Grundsubstanz" bezeichnet.

Der Begriff "Grundsubstanz" wurde von VIRCHOW zur Charakterisierung der verschiedenen Erscheinungsformen des Bindegewebes verwendet. So heißt es in der "Cellularpathologie" (Seite 47): "Bindegewebe wird ein Gewebe genannt, dessen Grundsubstanz beim Kochen Leim (Colla, Gluten) gibt; Knorpel liefert aus seiner Zwischenmasse Chondrin, Schleimgewebe einen durch Alkohol fällbaren und in Wasser wieder aufquellenden, dagegen in Salz- und Salpetersäure löslichen Stoff, das Mucin."

Diese etwas umständlich erscheinende Beschreibung mit Hilfe grober chemischer Methoden ist durch zahlreiche biochemische Untersuchungen in den letzten Jahrzehnten substantiiert und in ihrer prinzipiellen Richtigkeit bestätigt worden. Hierauf soll später noch näher eingegangen werden.

Da sich unsere Untersuchungen mit dem lockeren -was gleichbedeutend ist mit weichen- Bindegewebe beschäftigen, soll hier auch VIRCHOW's Beschreibung des weichen Bindegewebes zitiert werden. Ebenfalls in der"Cellularpathologie" heißt es auf Seite 139: "Das weiche Bindegewebe verhält sich daher, abgesehen von den in dasselbe eingelagerten, dem Bindegewebe als solchem nicht angehörigen Teilen, (Gefäßen, Nerven, Muskeln, Drüsen) wie das harte; überall ein Netz verzweigter und untereinander anastomosierender Zellen in einer großen Schwankung der Consistenz und der inneren Zusammensetzung unterworfenen Grundsubstanz."

Heute wird die Grundsubstanz von einigen Autoren auch Interzellularsubstanz genannt. Nach ihrem lichtmikroskopischen Verhalten unterscheidet LETTERER (ebenfalls SCHADE) plastische und paraplastische Grundsubstanz.

Es werden nach dieser Definition kollagene und elastische Fasern sowie Retikulinfibrillen als paraplastische Substanz der ungeformten i.e. plastischen Grundsubstanz gegenübergestellt. Andere Autoren (FLOREY, BÜCHNER, BEAMER u.a.) bezeichnen hingegen nur die ungeformte nicht fibilläre Matrix des Bindegewebes als Grundsubstanz. Diese rein morphologische Definition, die durch ein Fehlen lichtmikroskopischer Struktur gekennzeichnet ist, wird durch neuere elektronenmikroskopische Untersuchungen in Frage gestellt (WASSERMANN). Es wird von bio- und histochemischer Seite wieder ein chemisches Charakteristikum in den Vordergrund gerückt, nämlich der Gehalt der Grundsubstanz an sauren Mukopolysacchariden.

In dieser Arbeit soll das ungeformte Material zwischen den Zellen und Fasern, das durch seinen Gehalt an sauren Mukopolysacchariden gekennzeichnet ist, als Grundsubstanz bezeichnet werden. Der Raum, in dem sich diese Grundsubstanz ausbreitet, wird begrenzt durch die Bindegewebszellen mit ihren Membranen, die paraplastische Substanz und Membransysteme, wie z.B. die Grundhäutchen. Obwohl die Grundsubstanz morphologisch den Eindruck einer gewissen Homogenität vermittelt, stellt die Grundsubstanz chemisch ein außerordentlich komplexes Gemisch aus Verbindungen verschiedener Stoffklassen dar. Die Grundsubstanz des Bindegewebes ist genau wie das Bindegewebe selbst ein sehr variables System . Lokalisation und organspezifischer Differenzierungsgrad vermögen -wie schon VIRCHOW feststellte- ihre quantitative und qualitative chemische Zusammensetzung entscheidend zu verändern.

Die Basis für bestimmte verallgemeinernde Aussagen über die Chemie der Grundsubstanz bildet die Tatsache, daß alle Bindegewebsformen aus einem Grundtyp des embryonalen Bindegewebes hervorgegangen sind und erst in der Ontogenese einen spezifischen Differenzierungsgrad erreicht haben.

Chemisch ist die Grundsubstanz -wie schon erwähnt- charakterisiert durch ihren Gehalt an sauren Mukopolysacchariden. Es handelt sich dabei um hochpolymere unverzweigte Kohlenhydratketten, die über ihre prosthetischen Gruppen polare und konvalente Bindungen mit Proteinen eingehen und so mehr oder weniger feste Mukopolysaccharid-Protein-Komplexe bilden (BUDDECKE).
Umfangreiche biochemische Analysen der Grundsubstanz haben ergeben, daß sich alle sauren Mukopolysaccharide (s MPS) aus einfachen Grundeinheiten zusammensetzen, die in folgender Tabelle übersichtlich zusammengestellt sind:

Saure Mukopolysaccharide der bindegewebigen Grundsubstanz

Name	Bestandteile	Molverh.	Verknüpfungen
Hyaluronsäure	Glucuronsäure Acetylglucosamin	1 1	$\left[Gs(1\overset{\beta}{-}3)N\text{-}Ac\text{-}Gl(1\overset{\beta}{-}4) \right]_n$
Chondroitinschwefelsäure A	Glucuronsäure Acetylgalaktosamin	1 1	$\left[Gs(1\overset{\beta}{-}3)N\text{-}Ac\text{-}Gal\text{-}4\text{-}sulfat(1\overset{\beta}{-}4) \right]_n$
Chondroitinschwefelsäure B	Iduronsäure Acetylgalaktosamin	1 1	$\left[Is(1\text{-}3)N\text{-}Ac\text{-}Gal\text{-}4\text{-}sulfat(1\overset{\beta}{-}4) \right]_n$
Chondroitinschwefelsäure C	Glucuronsäure Acetylgalaktosamin	1 1	$\left[Gs(1\overset{\beta}{-}3)N\text{-}Ac\text{-}Gal\text{-}6\text{-}sulfat(1\overset{\beta}{-}4) \right]_n$
Heparin	Glucosamin Galaktosamin Glucuronsäure Schwefelsäure u.a.	? ? ? ?	unbekannt
Keratosulfat	Galaktose Acetylglucosamin Schwefelsäure	1 1 ?	$\left[Gal(1\overset{\beta}{-}3)N\text{-}Ac\text{-}Gl\text{-}6\text{-}sulfat(1\overset{\beta}{-}4) \right]_n$
Chondroitin	Glucuronsäure Acetylgalaktosamin	1 1	$\left[Gs(1\overset{\beta}{-}3)N\text{-}Ac\text{-}Gal(1\overset{\beta}{-}4) \right]_n$

Regelmäßige aber chemisch weniger gut definierte Bestandteile der Grundsubstanz sind eine Reihe von kohlenhydrathaltigen Proteinen (Glycoproteide), die wegen ihres niedrigen oder fehlenden Gehaltes an Uronsäuren und Estersulfaten auch als neutrale Mukopolysaccharide (n MPS) bezeichnet werden. Chemisch verhalten sie sich vorwiegend wegen ihres hohen Gehaltes an Protein wie Eiweiß. Sie enthalten aber auch Glucose, Galaktose, Mannose, Fruktose und Neuraminsäure.

Weiterhin finden sich in der Grundsubstanz Proteine, die zum größten Teil noch unbekannt oder in ihrer chemischen Zusammensetzung ungenau charakterisiert sind, in spärlichem Maße Lipide und vor allen Dingen die physiko-chemisch sehr wichtigen Ionen.

Die Beziehung der MPS zu den faserigen Elementen ist eine in der Literatur häufig bearbeitete Frage (J. GROSS, M.SCHUBERT, PORTER, HÖRMANN und viele andere), die aber noch nicht eindeutig beantwortet ist. Diesbezügliche Untersuchungen beschäftigen sich in erster Linie mit der Entstehung von kollagenen Fasern. Nach diesen Untersuchungen ist anzunehmen, daß die s MPS eine wichtige Funktion bei der Zusammenlagerung von löslichen kollagenen Vorstufen (Tropokollagen) zu festen unlöslichen Fasern haben. Ob die Retikulinfibrillen Vorstufen von kollagenen Fasern sind oder faserige Elemente sui generis, ist nicht eindeutig entschieden (JORPES, JACKSON). Nach DETTMER sowie VEITH und OTTO sind Retikulinfasern charakteristische Strukturen der kollagenen Fasern, aber lichtmikroskopisch nur unter krankhaften Bedingungen darstellbar.

Der größte Teil der Grundsubstanzbestandteile stammt aus dem Blut, besonders die Ionen, außerdem gewisse Proteine und das Lösungswasser. Andere Proteine, z.B. das Tropokollagen, werden in den Fibroblasten gebildet.

Die Fibroblasten sollen auch der Hauptbildungsort der s MPS sein. Es wird aber auch diskutiert, ob nicht die Mastzellen (ASBOE-HANSEN) oder die Gefäßendothelien (CURRAN) die s MPS synthetisieren.

Die n MPS werden ebenfalls von den Fibroblasten sezerniert (GERSH und CATSCHPOLE, JACKSON). Wobei allerdings die Möglichkeit besteht, daß die Fibroblasten die permeierenden Plasmaglycoproteide konzentrieren, ohne sie eigentlich zu transformieren.

In der gelartigen Grundsubstanz sind also zelluläre und humorale Produkte zu einem polydispersen System vereint. Da die s MPS teils frei, teils mehr oder weniger fest an Protein gebunden sind, können ihre physiko-chemischen Eigenschaften den Gehalt des Interzellularraumes an elektrisch geladenen Substanzen beeinflussen, die sich wiederum auf die Flüssigkeitsmenge auswirken.

Alle Stoffe, welche eine Zelle erreichen sollen oder von einer Zelle abgegeben werden, müssen die Grundsubstanz passieren. Es ist daher verständlich, daß die Grundsubstanz regulierend auf den Stoffwechsel der Zellen wirkt (SCHADE). Die Grundsubstanz dient also nicht nur als anatomische, sondern auch als physiologische Stützsubstanz für die Mesenchymzelle (DURAN-REYNALDS). Aus diesen Überlegungen folgt, daß man die Bindegewebszelle mit ihrer umgebenden ungeformten und geformten Grundsubstanz als eine physiologische Einheit betrachten muß, dessen sehr labile Ordnung durch ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Zellstoffwechsel und der Grundsubstanz aufrecht erhalten wird.

Dieses Fließgleichgewicht kann sehr leicht durch die verschiedensten Schädlichkeiten gestört werden (SCHADE,SCHALLOCK,SCHMIDT-MATTHIESEN, LINDNER). Es ist seit langem bekannt, daß bei jeder Entzündung die Grundsubstanz und die in ihr enthaltenen Fasern Veränderungen erleiden (EHRLICH).

Die normalerweise vorhandenen Verbindungen zwischen s MPS und den nicht faserigen Grundsubstanzproteiden werden bei der akuten Entzündung gelöst. Dieser Vorgang wurde als Desaggregation (SCHALLOCK) oder auch als Entmischung (SCHMIDT-MATTHIESEN) bezeichnet. Physiko-chemisches Substrat dieses Vorganges ist eine mehr oder weniger starke Dissoziation des Kohlenhydrat-Protein-Komplexes, als dessen Folge es zu einer Erhöhung des kolloid-osmotischen Druckes im Interzellularraum kommt. Es setzt dann eine verstärkte Insudation humoraler Stoffe ein. Diese entzündliche Gefäßausschwitzung hat proteolytische und esterspaltende Fähigkeiten (MASSHOFF) und bewirkt ein weiteres Ansteigen des kolloid-osmotischen Druckes. Durch diesen Mechanismus kann man sich die Entstehung eines entzündlichen Oedems vorstellen.

Experimentelle Überprüfungen dieser Vorstellungen stammen von LINDNER. Diese Untersuchungen zeigen, daß es 2-4 Stunden nach der Reizsetzung zu einer feststellbaren Grundsubstanzentmischung kommt, die sich primär als perivaskuläre Aufquellung mit Auflösung der Gefäßmembran zeigt. Im weiteren Ablauf der Reaktion kommt es dann zu einer Verquellung der kollagenen Faser. Diese Beobachtung wurde auch schon von ZIEGLER 1887 beschrieben. Die Veränderungen müssen aus den obigen Überlegungen zu einer Beeinflussung des Stoffwechsels der Bindegewebszellen führen. Es ist also bei der entzündlichen Irritation des Bindegewebes vaskulär-humorale und histiogene Reaktion über die Grundsubstanz auf das engste verbunden.

Je nach Quantität und Qualität des Reizes tritt die eine oder die andere Komponente mehr in den Vordergrund. Man hat daher als funktionell-morphologische Formen eine exsudative und eine proliferierende Entzündung unterschieden oder als Stadien eine akute und eine chronische (LETTERER).

Die reaktive Entstehung von Bindegewebe ist als ein biologischer Eigenvorgang aufzufassen, der einsetzt und dann selbständig abläuft, wenn bestimmte physiko-chemische Voraussetzungen gegeben sind. Diese Voraussetzungen können -wie gesagt- durch zahlreiche Noxen gegeben sein, ohne daß sich diese primäre Verschiedenheit in dem bindegewebigen Reaktionsprodukt abzeichnet.

Da die Grundsubstanz bzw. ihre kohlenhydrathaltigen Bestandteile mit einfachen histochemischen Methoden während ihrer Bildung nur im wachsenden Bindegewebe erfaßt werden kann, bietet sich das Proliferationsgewebe einer chronischen Entzündung als Gegenstand für unsere Untersuchungen an. Auf der Suche nach einem geeigneten Modell zur Erzeugung einer proliferierenden Entzündung schien uns das Talkumgranulom (ANTOPOL, ZÜLLIG, CURRAN) bzw. das Paraffingranulom (ARAMBAŠIĆ) als besonders geeignet.

Um ein möglichst gleichmäßiges von zusätzlichen Reizen freies Proliferationsgewebe zu bekommen, ist die von SELYE angegebene "Granuloma-pouch"-Technik (Granulombeutel) sehr geeignet.
An Hand dieses Modells sollte

1. die Bildung von MPS in der Grundsubstanz verfolgt und eine Beziehung zur Faserbildung untersucht werden,

2. durch geeignete Maßnahmen die Bildung von Grundsubstanz unterbrochen werden, um eine Modifikation der Reaktion zu erreichen.

Diesen beiden Fragestellungen sollen noch einige einleitende Bemerkungen vorangestellt werden.
Zur histochemischen Darstellung der Grundsubstanz und der in ihr enthaltenden Kohlenhydrate -speziell der s MPS- sind in der Literatur zahlreiche Methoden angegeben. Die älteste Methode ist die Darstellung der Grundsubstanz durch den basischen Thiazofarbstoff Toluidinblau (Tol).

Die s MPS bewirken eine Metachromasie (dieser Begriff wurde 1877 von P. EHRLICH geprägt) des Farbstoffes (Änderung der Absorptionsmaxima). Nach Untersuchungen von SCHEIBE und Mitarbeitern ist der Farbumschlag durch einen physiko-chemischen Mechanismus zu erklären. Bei dem Zusammentreffen des basischen Farbstoffes mit einem sauren Kolloid werden die Farbstoffkationen an anionischen Gruppen bis zur elektrostatischen Absättigung adsorbiert. Dieser Vorgang allein führt noch nicht zur Metachromasie. Ein Farbumschlag tritt erst ein, wenn ein Mindestabstand von 3-5 Å zwischen den anionischen Gruppen am chromotropen Träger vorliegt. Bei den s MPS tragen die Sulfatgruppen die anionischen Ladungen, welche die kationischen Farbstoffe adsorbieren. Im Reagenz-Glas konnte gezeigt werden, daß der Abstand der Schwefelester in der Chondroitinsulfateinheit zur Bildung eines metachromatischen Farbumschlages ausreicht. Mit dieser Vorstellung über die Entstehung der Metachromasie kann auch der viel kräftigere Farbumschlag der Heparin-Granula in den Mastzellen erklärt werden. Heparin enthält nämlich pro Disaccharideinheit mindestens 3 Sulfatgruppen.

Eine weitere bewährte und in ihrer Wirkungsweise bekannte Methode zur Darstellung von Kohlenhydraten ist die PAS-Reaktion (periodic acid Schiff-reaction), die zuerst von McMANUS und HOTCHKISS in der Histologie angewendet wurde. Über den Mechanismus der Reaktion ist folgendes bekannt: Durch die Perjodsäure werden benachbarte OH-Gruppen (unter gewissen Bedingungen auch benachbarte NH_2- und OH-Gruppen) zu Aldehydgruppen oxydiert und dann die Kohlenstoffbindung getrennt. Leukofuchsinwird von diesen reaktionsfähigen Gruppen in Fuchsin umgewandelt. Durch Azetylierung dieser OH-Gruppen und anschließende Hydrolyse soll es nach GRAUMANN, SCHIEBLER und GEDIGK möglich sein, Mukopolysaccharide von Glykogen zu trennen.

Die von HALE angegebene Eisenadsorptionsfärbung beruht darauf, daß kolloidales Eisen an saure Gruppen von Makromolekülen -wahrscheinlich Carboxyl-Gruppen- angelagert wird. Dieses Eisen kann anschließend mit einer gewöhnlichen Berliner-Blau-Reaktion topographisch nachgewiesen werden.

Der Wollfarbstoff Alcianblau, von STEEDMANN in die Histochemie eingeführt, färbt ebenfalls unter gewissen Voraussetzungen nur die s MPS an. Diese Färbung zeigt in ihrer Intensität eine starke Abhängigkeit von pH-Wert der Farblösung, so daß ebenfalls eine elektrostatische Anlagerung an die anionischen Gruppen vermutet werden kann. Bei einem pH-Wert von 2,3 - 3,0 soll diese Färbung nach in-vitro-Versuchen (RIZZOLI) für Chondroitinschwefelsäure spezifisch sein.

Mit diesen Methoden lassen sich immer nur die Seitengruppen der hochmolekularen Polysaccharide erfassen. Eine Möglichkeit, das Kohlenhydratskelett direkt anzugreifen, ist durch Fermente gegeben, die wie Hyaluronidase glycosidische Bindungen in den Makromolekülen spalten.
Durch den gleichzeitigen Einsatz dieser verschiedenen Methoden können die s MPS verfolgt werden.

Ein Problem bei der Darstellung der Mukopolysacchariden in der Grundsubstanz ist die Fixierung der zu untersuchenden Gewebe. Es ist zu erwarten, daß durch die Fixierung in die kolloidale Struktur der Grundsubstanz nicht unerheblich eingegriffen wird. Das histologische Bild kann also in dieser Beziehung die physiologischen Verhältnisse nicht absolut getreu wiedergeben. Nach der Fixierung finden sich die Mukopolysaccharide entweder in einem feinen Netzwerk, welches sich spinngewebeartig zwischen den Fasern und Zellen ausbreitet oder als kompakte Schollen. Es muß bei der Fixierung möglichst dafür Sorge getragen werden, daß sich wenig Grundsubstanzkohlenhydrate in der Fixierungsflüssigkeit lösen.

Bewährt hat sich die Fixierung der Gewebe in Bleiazetat (LILLIE) Carnoy-Lösung, Bouin-Lösung, Gendre fluid und gepuffertem Formalin, Wir verwendeten mehrere Fixierungsverfahren für die entsprechenden Untersuchungszeiträume, um durch Vergleichsbeobachtungen Artefakte auszuschließen.

Über den zeitlichen Ablauf der Bildung von Mukopolysacchariden in den Bindegewebszellen finden sich in der Literatur zahlreiche Angaben. Jedoch beziehen sich diese besonders auf die an s MPS-reichen Gewebe wie Knorpel, Knochen und Nabelschnur. TAYLOR und SAUNDERS vertreten die Meinung, daß nur junge Fibroblasten die s MPS bilden können und daß sich an diese Phase die Faserbildung anschließen würde. Dagegen konnte am Paraffingranulom gezeigt werden (ARAMBÁSIC), daß während einer langen Zeitspanne Mukopolysaccharide entstehen und sogar die Synthese in den Bindegewebszellen erst in der 4. Woche ihren Höhepunkt erreicht. In dieser Arbeit wurde in kontinuierlichen Zeitabschnitten die Bildung der Grundsubstanz verfolgt und eine histochemische Differenzierung versucht. Der Zeitraum zwischen dem 5. und dem 40. Tag nach Beginn der Proliferation stand im Vordergrund der Untersuchungen.

Zur zweiten Fragestellung unserer Arbeit seien ebenfalls einige Vorbemerkungen gemacht.
Eine Möglichkeit zur Beeinflussung der Bildung der Grundsubstanz scheint in der Verabreichung von lathyrogenen Stoffen gegeben zu sein. Durch Verfütterung von Lathyrus odoratus-Samen, läßt sich bei jungen Tieren ein generalisierter Mesenchymschaden erzeugen (DOERR), der sich in Unterwuchs, Skelettdeformitäten, abnormer Zerreißlichkeit der Bindegewebsfasern, dissezierende Gefäßerkrankungen und Exostosen manifestiert. Als toxischer Stoff ist aus den Samen der Kichererbse (Lathyrus odoratus) ß-(1-glutamyl-) Aminopoprionitril isoliert worden (DASSLER). Ferner konnte gezeigt werden, daß sich durch ß-Aminopoprionitril die gleichen Schäden hervorrufen lassen.

Über den Angriffspunkt dieses Giftes werden in der Literatur verschiedene Hypothesen diskutiert. Zahlreiche Befunde sprechen dafür, daß das Gemeinsame aller Bindegewebsveränderungen in einer Störung des Stoffwechsels der s MPS in den Bindegewebszellen zu erblicken ist. Andere Deutungsmöglichkeiten sollen später diskutiert werden.

Die Applikation von ß-Aminopöprionitril (ß-APN) führt nach dieser Hypothese (HARTMANN) zu einer Hemmung der Produktion von s MPS. Damit kommt es zu einer Störung des funktionellen Systems Bindegewebszelle-Grundsubstanz-Faser. Das Gleichgewicht von Aufbau und Abbau der s MPS wird in Richtung Abbau verschoben. Da die s MPS zur Kondensierung der faserigen Substanzen erforderlich sind, werden zu wenig oder atypische Fibrillen gebildet. Die diesbezüglichen Untersuchungen wurden hauptsächlich mit biochemischen Methoden an den grundsubstanzreichen Knorpel- und Knochengeweben junger Tiere durchgeführt. Doch gibt es auch Arbeiten, in denen die Wirkung von ß-APN auf die Wundheilung (KRIKOS und ORBISON), das experimentelle Granulom durch Carrageenin (HURLEY und HAM), das Granulationsgewebe subcutan implantierter Polyvinyl-Späne (ENZINGER und WARNER), den Terpentinölabszeß (MIELKE) geprüft wurde und in denen darauf hingewiesen wird, daß das neugebildete Bindegewebe in typischer Weise geschädigt werden kann.

DerLathyrismus wird von den meisten Untersuchern an jungen Ratten oder Hühnerembryonen erzeugt. Doch haben McCALLUM und auch PETERSEN gezeigt, daß sich grundsätzlich gleiche Veränderungen auch an jungen Mäusen hervorrufen lassen. LEWIS und SCHUBERT konnten dagegen an 12- 15 gr schweren weißen Mäusen auch nach 17-wöchiger Fütterung mit einer Nahrung, die 50% Lathyrus odoratus-Samen enthielt, keinen Lathyrismus erzeugen.

Im proliferierenden Gewebe der Granulomtaschen liegen ähnliche Verhältnisse wie im Bindegewebe junger Tiere vor. Es ist daher zu erwarten, daß die Applikation von ß-APN in unserem Modell ähnliche Veränderungen hervorrufen wird.

B. Eigene Untersuchungen

1. Methoden:

Die Versuche wurden an männlichen und weiblichen Albinomäusen eines institutseigenen Inzuchtstammes durchgeführt. Die Tiere wogen zwischen 20 und 32 gr, bekamen Standardfutter (Fa. Latz) und wurden in einem gleichmäßig belüfteten Raum unter möglichst konstanten Bedingungen in Käfigen mit 3-5 Tieren gehalten. Die chronische bindegewebsbildende Entzündung wurde mittels Talkum, Paraffin oder Fibrospum erzeugt. Es wurde die Luft-Taschen-Technik nach SELYE wie folgt angewendet: den mit Äther narkotisierten Tieren wurden die Haare der unteren Rückenpartie mit der Schere geschnitten, die Haut mit Jodtinktur desinfiziert, 2,0 ml Luft in das subcutane Bindegewebe eingespritzt und anschließend durch die liegenbleibende Kanüle 0,5 ml einer sterilen Talkumsuspension (1,0 gr Talkumpuder (1) in 10 ml Aqua dest) oder 0,5 ml bzw. 0,2 paraffinum liquidum in den Beutel instilliert. In einer Versuchsreihe wurde die Talkumsuspension direkt d.h. ohne Lufttasche in das subcutane Bindegewebe injiziert. Fibrospum wurde in ca. 0,5 cm^2 große Stückchen unter aseptischen Bedingungen in das subcutane Bindegewebe der gleichen Rückenpartie implantiert. Um die bindegewebsbildende Entzündung zu modifizieren, wurden Tiere, die mit einem Granulombeutel versehen waren, gleichzeitig mit ß-APN (2) behandelt. Einzelheiten der Versuchsanordnung sind aus den Tabellen II und III zu entnehmen.

Fußnote I. Talkumpuder ist zermahlenes Magnesiumsilikat. Histologisch stellt es sich als doppeltbrechende wetzstein- oder nadelförmige Kristalle dar. Die chemische Zusammensetzung des Talkums wird in den Handbüchern verschieden angegeben, jedoch meist mit $Mg_2[Si_4O_{10}]$. $Mg(OH)_2$. Diese Tatsache ist wohl unter anderem darauf zurückzuführen, daß die Zusammensetzung des Talkums je nach Fundort etwas variiert. Talkum ist wasserunlöslich.

Fußnote II. ß-APN: ß-Aminopoprionitril, 2-Amino-1-Cyan-Äthan, 3-Aminopoprionsäurenitril, ß-Alaninnitril. Es ist ein in Wasser nur schwer löslicher Stoff. Sein Hydrochlorid BAPN. HCL ist dagegen gut wasserlöslich.

Strukturformel: $NH_2-\overset{H}{\underset{H}{C}}-\overset{H}{\underset{H}{C}}-C \equiv N$ ($H_6\ C_3\ N_2$)

Molgewicht : 70,09

Die Substanz wurde von der Fa. Eka-Chemie bezogen.

Die Tiere wurden in Äther-Narkose in bestimmten Zeitabschnitten getötet (siehe Tabelle II und III). Die Granulombeutel wurden im Ganzen entnommen, in Bleiazetat (LILLIE), gepuffertes Formalin (LISON), Gendre fluid, Bouinsche Lösung (nach ROMEIS) fixiert. Übliche Paraffineinbettung. In besonderen Fällen wurden zusätzlich Kryostatschnitte an unfixiertem Material ausgeführt.

Färbungen: Hämalaun-Eosin (MAYER), Versiberung (GOMÖRI), Pikrinsäure-Fuchsin (van GIESON), Trichrom-Färbung (MASSON-GOLDNER).

Zur Darstellung der Grundsubstanz-Kohlenhydrate wurde die PAS-Reaktion (McMANUS, HOTCHKISS) angewendet, teilweise wurden außerdem die von GRAUMANN angegebenen Differenzierungen durchgeführt. Färbungen mit Toluidinblau (1) erfolgten in 1%, 0,5%, 0,3% Lösung bei verschiedenen pH-Werten. Eingedeckt wurden diese Schnitte teilweise mit dem wasserlöslichen Karion F (Fa. Merck). Die Eisenadsorptionsfärbung nach HALE wurde in der von MÜLLER angegebenen Modifikation ausgeführt (EH). Mit Alcianblau wurde bei pH 3 mit einer 1% Farbstofflösung in 3% Essigsäure oder mit einer 0,5%igen Farbstofflösung in 0,5% Essigsäure (LISON) gefärbt. Die Zellkerne wurden anschließend mit Kernechtrot dargestellt. Außerdem wurde die HALE- mit der PAS-Reaktion einerseits und Alcianblau mit der PAS-Reaktion andererseits kombiniert angewendet.

Für die Fermentinkubierungen wurde Hyaluronidase aus Testes (2) Kinetin (Fa. Schering) benutzt. Die Schnitte wurden in Lösungen von 100 E, 200 E und 300 E Kinetin/100 ml phys. NaCl über Nacht bei 37° inkubiert, Kontrollschnitte für die gleiche Zeit einer phys. NaCl-Lösung ausgesetzt. Die Kontroll- und die mit Kinetin behandelten Schnitte wurden immer zusammen gefärbt, um aus der Färbetechnik etwaige resultierende Differenzen auszuschließen.

Fußnote 1. Toluidinblau nach HOYER d. Fa. Merck.

Fußnote 2.

Kinetin-Einheit:

Menge von Hyaluronidase, die 0,5 ml Standard-Hyaluronsäure bei 30°C und pH 4,0 in 10 Minuten die relative Viskosität auf die Hälfte herabsetzt.

Tabelle II

Versuchsanordnung	Anzahl d.Tiere	Std.	Tage									
		3/4	2	3	5	10	15	20	25	30	35	40
Talkumgranulombeutel	45	1	1	1	7	6	5	5	5	5	5	5
Talkumgranulom	6				2	2	2					
Paraffingranulombeutel	4					1				1		
Fibrospun	3				1	1	1					

Tabelle III

Substanz	Technik	Injektionsort	Anzahl d.Tiere	Tage				Menge der täglichen Injektion
				5	7	10	15	
ß-aminopropionitril	Talkumgranulombeutel	s c	9	3	2			1 mg/gr Körpergew.
		in den Beutel	4	4				0,01 mg/gr
		i p.	3					0,5 mg/gr
	PARAFFINgranulombeutel	s c	2	2				0,01 mg/gr
		i p.	2	2				0,5 mg/gr
ß-aminopropionitrilhydrochlorid	Talkumgranulombeutel	s c	3					200 mg/Tier
		s c	3					180 mg/Tier
		s c	1	1				60 mg/Tier
		in den Beutel	3	1		1		30 mg/Tier
		i p.	3	1		1	1	30 mg/Tier
		i p.	3	1		1	1	5 mg/Tier
		i p.	3	1		1	1	1 mg/Tier

2. Befunde - I. Teil -

a) Mäusehaut:

Zur Orientierung und Kontrolle dienten Hautstücke aus der Rückenpartie nicht vorbehandelter Mäuse.

Die Haut zeigt einen typischen Bau. Die Epidermis besteht aus einem gleichmäßigen Leisten aufweisenden Papillarkörper, dem als epidermales Epithel ein gleichmäßig geschichtetes orthologisch verhornendes Plattenepithel aufgelagert ist, Das unter der Epidermis gelegene Corium wird aus einer kapillararmen Schicht verflochtener kollagener Fasern gebildet. In dem anschließenden Fettgewebe liegen gleichmäßig verteilte Gefäße vor allem in der Nähe der im subcutanen Fettgewebe auftretenden Hautmuskulatur.

In der normalen Haut sind folgende histochemische Befunde zu erheben. Es finden sich zahlreiche PAS-positive Granula in den basalen Epithelzellen, gröbere PAS-positive Schollen in den Haarbälgen und -wurzelscheiden. Die Retikulinfibrillen geben eine starke,die kollagenen Fasern eine schwache PAS-Reaktion. Ein Teil der Grundsubstanz färbt sich mit Alcianblau grünblau an, diese ist an den Rändern der kollagenen Fasern angereichert. Mit EH läßt sich Grundsubstanz als ein feines Netz darstellen; dieses ist durch Hyaluronidase zerstörbar. In den Interzellularräumen findet sich keine metachromatische Substanz; die Mastzellen enthalten in reichlichem Maße metachromatische Granula. Vereinzelt lassen sich auch PAS-EH- und Acianblau-positive Granula in den Mastzellen nachweisen.

b) Talkumgranulombeutel

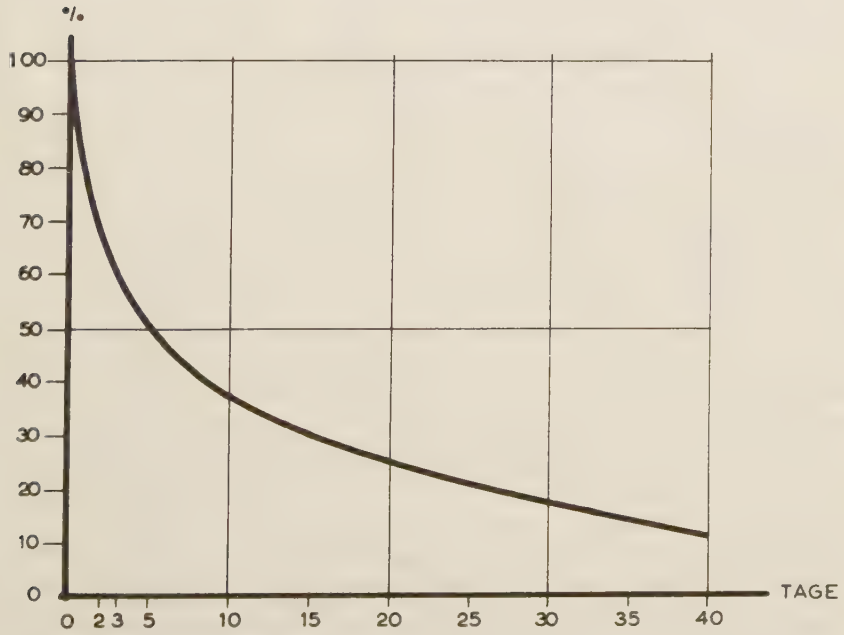
a) Makroskopische Befunde:

Zum Studium des Verhaltens der Granulombeutel (GB) wurde bei insgesamt 45 Mäusen GB in der beschriebenen Weise angelegt und die Beutel zu den in Tabelle I angegebenen Zeiten vermessen und weiter analysiert.

Die frühen GB besitzen im Durchschnitt eine Grundfläche von 2-3 cm. Die nicht von Epidermis bedeckte Wand des GB ist cellophanartig durchsichtig und läßt deutlich einen feinen Niederschlag von eingespritzten Talkumkristallen erkennen.

In den folgenden Tagen verkleinerte sich der GB rasch, wobei die Verkleinerung auf einer Resorption von Luft beruht. Nach etwa 5 Tagen ist der GB auf etwa die Hälfte zusammengeschrumpft, nach 15 Tagen ist die Luft resorbiert. Über die durchschnittliche Größe der GB unterrichtet das nachfolgende Diagramm.

Die ersten Gefäße sind in der Wand nach 2-3 Tagen erkennbar. Ebenfalls nach 2-3 Tagen kommt es zu einer sichtbaren Ausschwitzung von klarer Flüssigkeit, die sich später trübt. Mit zunehmender Verkleinerung der GB wird das Exsudat wieder resorbiert und nach 25 - 30 Tagen ist es verschwunden.



VERKLEINERUNG DER GRUNDFLÄCHE DER TALKUMGRANULOMBEUTEL

b) Histologische Befunde:

Histologisch zeigen die Talkumgranulombeutel folgendes Bild:
45 Minuten nach der Injektion von Luft und Talkum in das subcutane Bindegewebe zwischen Corium und Hautmuskulatur besteht die Wand des Beutels zunächst aus zerrissenen präexistenten Fasern und Bindegewebszellen. Zwischen diesen Strukturen tritt eine netzig geronnene eosinophile Flüssigkeit auf. In diese Wand beginnen aus den benachbarten Kapillaren mehr oder weniger reichlich Leukocyten einzuschwärmen. Die Talkumkristalle liegen der Innenfläche an. Nach 2 Tagen sind diese von einer gleichförmig eosinophilen Substanz umgeben, in der sich diffus verteilt Kerntrümmer befinden. Die Beutelwand wird durch ein ungleichmäßig dickes Band aus stark eosinophilem Material gebildet, in dem Bindegewebszellen eingebettet liegen und dessen Ausprägung eine Abhängigkeit von der Gefäßversorgung zeigt. In diesem Randsaum liegen zahlreiche Leukocyten und Bindegewebszellen, die sich im Sinne einer Aktivierung umgewandelt haben. Nach 3 Tagen bietet sich prinzipiell das gleiche Bild. Jedoch sind alle Reaktionen deutlicher ausgeprägt. Die Wand des Beutels ist durch ein Oedem vom umgebenden Bindegewebe abgesetzt. Nach 5 Tagen findet sich ein typisches Proliferationsgewebe mit viel eosinophiler Interzellularsubstanz. Die Zahlen der histiogenen Zellen und deren Differenzierungsgrad zeigen eine Abhängigkeit von der Gefäßversorgung. Unter der Talkumschicht ist die Wand 5-8 Zellschichten dick. Unter einer dünnen Talkumschicht zeigt sich ein angedeuteter schalenartiger Aufbau der Wand. Die außen liegenden Kristalle sind teilweise durch Riesenzellen umflossen, darüber liegt eine dünne Fibroblastenschicht (1-2 Zellen) mit parallel ausgerichteten argyrophilen Fibrillen. In der nach innen folgenden Talkumschicht zeigt sich eine beginnende Einsprossung undifferenzierter Mesenchymzellen. Die Wand ohne Talkumbelag

zeigt eine dünne aus 2-3 Zellschichten bestehende Wand aus Fibroblasten und argyrophilen Fibrillen. Die Haut und ihre Anhangsorgane über den Granulombeuteh sind nicht verändert.

Mastzellen (MZ) liegen außer im Corium vereinzelt auch neben einsprossenden kapillaren Gefäßen. Nach 10 Tagen ist fast das gesamte Beutellumen durch homogenes eosinophiles Material ausgefüllt. Der schalenartige Aufbau des Proliferationsgewebes ist jetzt deutlicher und umfaßt alle Abschnitte der Beutelwand. Gegen das umgebende lockere Bindegewebe ist der Granulombeutel durch eine dünne Membran aus parallel ausgerichteten kollagenen Fasern abgegrenzt. Kurze Zeit später sind praktisch alle nicht von Riesenzellen umflossene Talkumkristalle von argyrophilen Fasern umsponnen. Nach 20 Tagen hat die Zellproliferation einen gewissen Abschluß gefunden. Die Talkumschicht ist überall vollständig von jungen Bindegewebszellen durchwuchert. Zum Beutellumen zu befindet sich nun ebenfalls eine membranartige Schicht aus Fibroblasten. Es hat sich in diesem Zeitpunkt eine gewisse Dreischichtung des Proliferationsgewebes herausgebildet. Nach 25 Tagen finden sich auch zwischen den Talkumkristallen kollagene Fasern. Der bindegewebsbildende Charakter steht nun deutlich im Vordergrund der Entzündung. An der Grenze zwischen Wand und Lumen liegen vereinzelt Schaumzellen als Zeichen einer Resorption. Nach 30 Tagen ist die Beutelwand weitgehend von kollagenen Fasern durchsetzt, so daß der schalenartige Aufbau nicht mehr deutlich zu erkennen ist. Wenig später beginnt eine Kammerung des Beutellumens, dessen flüssiger Inhalt weitgehend resorbiert ist. Nach 40 Tagen ist die chronische Entzündung abgeschlossen. Das umgebende lockere Bindegewebe ist frei von Zeichen einer Irritation. Haut und Hautanhangsorgane zeigen gegenüber den Kontrollen keine Veränderungen.

Faßt man die histologischen Befunde zusammen, so zeigt sich, daß die Reaktionen des Organismus auf die Irritationen in mehreren Schritten abläuft, wie es allgemeinpathologisch von vornherein zu erwarten ist. Zunächst setzt eine exsudativ-

leukocytäre Reaktion ein, dann kommt es zu einer Aktivierung und Proliferation der ortsständigen Bindegewebszellen. Später bilden sich Riesenzellen vom Fremdkörpertyp aus, die Talkumkristalle aufnehmen.

Die Mehrzahl der Kristalle ist aber in der reichlichen Grundsubstanz eingebettet und von Fasern umgeben. Diese stellen zunächst reticuläre Fibrillen, später kollagene Fasern dar. Ist der Talkumbelag von Bindegewebszellen durchwuchert, bildet sich gegen das Lumen des Beutels eine zweite Membran, von der aus es zu einer Resorption des Exsudates und zu einer Aufteilung des Restlumen durch bindegewebige Stränge kommt. Die zu Beginn starke leukocytäre Exsudation tritt während der Beobachtungszeit immer weiter in den Hintergrund, bis sich nur noch vereinzelte kleine leukocytenreiche Nester finden. Die Dynamik in der chronischen Entzündung beim Talkumgranulombeutel kann durch folgende Schritte dargestellt werden:

	I		II		III		IV
Reiz:	Exsudation	→	Proliferation	→	Resorption	→	Stabilisierung

c) Histochemische Befunde:

Der Ausfall der histochemischen Reaktionen ist nur selten eindeutig positiv oder negativ. Meist ergeben sich quantitative Unterschiede, die subjektiv bewertet werden müssen, da es bei der Inhomogenität der Granulombeutel -erst recht bei Verlaufsbeobachtungen- keine Möglichkeiten gibt, durch objektive Meßverfahren zu exakten Vergleichswerten zu kommen. Eine zusammenfassende Darstellung ist deshalb nicht ganz einfach.

Zunächst soll auf die Mastzellen (MZ) eingegangen werden. Diese Zellen sind durch Granula gekennzeichnet, die sich mit Toluidinblau metachromatisch anfärben. Sie sind in den Schnitten stets einwandfrei nachzuweisen. Wie schon erwähnt, finden sie sich in großer Zahl vor allem im Corium der normalen Mäusehaut. Sie sind jedoch praktisch niemals in der Wand des Talkum-

granulombeutels oder eines anderen experimentell erzeugten Proliferationsgewebes bei der chronischen Entzündung zu finden. Danach kann also offenbar den MZ keine Funktion bei der Bildung des Proliferationsgewebes zukommen.

Die Grundsubstanz des neugebildeten Bindegewebes wird demnach also von anderen Zellen produziert werden . Hierbei sind offensichtlich die Fibroblasten entscheidend beteiligt. Die histochemisch erhobenen Befunde an den Zellen des Proliferationsgewebes, der Grundsubstanz und den Fasern sollen im folgenden dargestellt werden:
In ganz frischen Granulombeutel nach 45' läßt sich in den Bindegewebszellen kein Hinweis für eine MPS-Synthese finden. Die Grundusbstanz gibt im Bereich der inneren Beutelbegrenzung eine schwache Metachromasie. Sie ist hier deutlich stärker alcianophil als im umgebenden Bindegewebe. Nach 2 Tagen lassen sich in einigen Bindegewebszellen des Beutelrandes bereits vereinzelt feine PAS-positive Granula nachweisen. Die Grundsubstanz in der Wand ist nunmehr nicht metachromatisch, aber deutlich alcianophil. Unter dem Talkumbelag findet sich eine schmale Zone mit stark PAS-positivem Material. Dieses liegt extrazellulär. Am Übergang von Beutelwand zum umgebenden Bindegewebe zeigt sich mit EH schollige streifige Substanz, die nach Hyaluronidase-Behandlung der Schnitte nicht mehr nachzuweisen ist. Nach 3 Tagen bietet sich fast das gleiche Bild, nur die PAS-positiven Substanzen sind deutlich vermehrt besonders unmittelbar unter dem Talkumbelag.

Nach der ersten Phase, die zu einer Aktivierung der ortsständigen Bindegewebszellen geführt hat, -die PAS-positive Granulierung ist dafür ein deutliches Zeichen- zeigt sich am 5. Tag ein Spektrum von histochemischen Befunden, wie es nach dem histologischen Bild in etwa erwartet werden konnte.

Zahlreiche Fibroblasten enthalten mehr oder weniger PAS-positive Granula, mit zum Teil perinukleärer Lagerung. Die Grundsubstanz im Proliferationsgewebe ist deutlich vermehrt und schwach PAS-positiv. In der Verschiebeschicht des umgebenden Bindege-

webes läßt sich die Grundsubstanz durch Alcianblau und EH darstellen. Durch Behandlung mit Hyaluronidase läßt sich nur dieses Material reduzieren.

Die neugebildeten argyrophilen Fibrillen sind stark PAS- positiv, während die präexistenten kollagenen Fasern nur eine sehr schwache PAS-Reaktion zeigen. Die Talkumkristalle, die von Proliferationsgewebe umgeben sind, liegen in einer homogenen Substanz eingebettet, die sich kräftig mit EH darstellen läßt. Diese EH-positiven Höfe sind nach Hyaluronidase deutlich schwächer gefärbt. In den 10 Tage alten GB wird die PAS-Granulierung der Fibroblasten in gut kapillarisierten Bezirken besonders deutlich. Es finden sich hier nunmehr auch vereinzelt EH-positive Granula. In der Grundsubstanz des Proliferationsgewebes mit bereits gebildeten kollagenen Fasern, findet sich jetzt auch EH-positives Material, das sich durch Hyaluronidase beeinflussen läßt. In der äußeren Schicht der Beutelwand ist die Grundsubstanz schwach metachromatisch. In dem umgebenden Bindegewebe zeigen sich außer den erwähnten Veränderungen an der Übergangszone keine Besonderheiten. In dem 15tägigen Granulombeutel ist die EH-Reaktion der um Talkumkristalle entstandenen Höfe nicht mehr durch Hyaluronidase zu beeinflussen. Nach 25 Tagen enthalten fast alle Bindegewebszellen des Proliferationsgewebes PAS-positive -in der Außenschicht auch einzelne EH-positive Granula. Das EH-positive Material zwischen den neugebildeten kollagenen Fasern ist deutlich vermehrt und durch Hyaluronidase angreifbar. Das Material, in das organisierte Talkumkristalle eingebettet sind, wird auch mit Alcianblau angefärbt.

Der histologisch feststellbare schalenartige Aufbau des Granulationsgewebes läßt sich in etwa auch histochemisch erkennen. In den Zellen der inneren Schicht liegen nur vereinzelt PAS-positive Granula, in der mittleren finden sich in allen Fibroblasten mehr oder weniger zahlreiche PAS-positive und vereinzelt auch EH-positive Granula, während in der äußeren Schicht

der Wand, die durch eine membranartige Anordnung von kollagenen Fasern gekennzeichnet ist, die Zahl der PAS-granulierten Zellen deutlich geringer ist und die EH-Granula häufiger auftreten. Nach 30 Tagen zeigen die Höfe um Talkumkristalle ihre größte Ausdehnung. Die EH-positive Substanz im Proliferationsgewebe ist jetzt nicht mehr hyaluronidase-sensitiv.

Das feine EH-positive Netz, das sich zwischen den kollagenen Fasern der Wand und in geringerem Maße auch zwischen den präexistenten Fasern des umgebenden Bindegewebes ausbreitet, wird hingegen durch Hyaluronidase zerstört. An der Grundsubstanz sind keine neuen Differenzierungen anzutreffen. Es fällt allerdings auf, daß die Grundsubstanz in den kleinen Nekroseherden, die sich vereinzelt in der Wand des Granulombeutels finden, sehr stark PAS-positiv ist. Nach 40 Tagen enthalten die Fibroblasten deutlich mehr EH-positive Granula als in den jüngeren Granulomen. Die grundsubstanzreiche Schicht, die auch die Fremdkörperriesenzellen enthält, ist schwach metachromatisch. Im übrigen ist der Anteil der PAS-positiven gegenüber der EH- und mit Alcianblau anfärbbaren Grundsubstanz reduziert.
Aus den histochemischen Befunden lassen sich unter kritischer Berücksichtigung der in der Einleitung dargelegten Möglichkeiten folgende Schlüsse ziehen:

1.) Am 2. Tag enthalten nur wenige Fibroblasten PAS-positive Granula. Die Zahl der PAS-granulierten Zellen steigt bis zum 10. Tag stark an. Dann nimmt ihre Zahl nur noch langsam zu, um den 25. Tag enthalten fast alle Bindegewebszellen des Proliferationsgewebes PAS-positive Granula.

2.) Schon im Beginn der histiogenen Reaktion zeigen sich vereinzelt EH-positive Granula in den Bindegewebszellen der Beutelwand. Diese EH-Granulierung wird im Laufe der Ausbildung des Organisationsgewebes häufiger. Zellen mit EH-Granula liegen aber grundsätzlich nicht im jungen Proliferationsgewebe, sondern immer in der äußeren älteren Schicht

der Beutelwand. Diese intrazellulären Granula sind durch Hyaluronidase nicht angreifbar.

3.) Die nicht organisierten Talkumkristalle sind vom 2. Tag an in eine schwach eosinophile PAS-positive Substanz eingebettet. Auf dem Talkumbelag liegt ein breiter Saum aus stark PAS-positiv reagierender homogener Substanz.

4.) Im jungen Proliferationsgewebe liegt viel ungeformte schwach mit PAS reagierende Grundsubstanz. Diese zeigt eine deutlich schwächere PAS-Reaktion als das Material, in welches die Talkumkristalle zunächst eingebettet sind.

5.) Die metachromatische Reaktion nach Toluidinblau-Färbung verhält sich in den GB sehr unterschiedlich und wechselnd. Zunächst zeigt sich in der inneren Beutelbegrenzung eine schwache Metachromasie, die sich wenig später nicht mehr nachweisen läßt. Nach 5 Tagen finden sich eine leichte durch Hyaluronidase beeinflußbare Metachromasie der Grundsubstanz in der Beutelwand. Nach 10 Tagen ist die Grundsubstanz einwandfrei orthochromatisch. Nach 15 Tagen findet man vereinzelt intra- und extrazelluläre metachromatische Granula in den äußeren Schichten des Granulationsgewebes. Im 30tägigen Granulombeutel erscheint nur im Bereich von Nekrosen eine leichte durch Hyaluronidase zerstörbare Metachromasie. Nach 40 Tagen ergibt die Grundsubstanz in der Umgebung von Fremdkörperriesenzellen einen metachromatischen Farbumschlag.

6.) Im jungen Proliferationsgewebe läßt sich kein mit EH reagierendes Material nachweisen. Im älteren kollagenen Fasern enthaltenden Organisationsgewebe findet sich EH-positive Substanz, die sich durch Hyaluronidase zerstören läßt.

7.) In der 3-Schichten-Phase enthält Granulationsgewebe am Übergang von der mittleren zur äußeren Schicht eine wolkig-schollige EH-positive Substanz. EH-positive extrazelluläre Granula treten vereinzelt auch schon um den 20. Tag auf, jedoch tritt nach 30 Tagen ein derartiges Material gehäuft auf, sie sind nicht

hyaluronidase-sensitiv.

8.) Die Grundsubstanz in der ödematösen Randzone ist deutlich alcianophil.

9.) Vom 5. Tag an findet sich um die organisierten Talkumkristalle ein stark mit EH reagierender Hof. Diese Reaktion ist zunächst durch Hyaluronidase zu beeinflussen. In den älteren Granulomen zeigt das Ferment keine Wirkung auf diese Substanz. Um den 30. Tag erreichen diese Höfe ihre größte Ausdehnung. Sie lassen sich vom 10. Tag an auch durch Alcianblau darstellen.

10.) Die argyrophilen Fibrillen geben eine sehr kräftige PAS-Reaktion. Sie verändern ihre PAS-Färbbarkeit im Laufe der Beobachtungszeit nicht. Durch Hyaluronidase wird die PAS-Reaktion der Fibrillen nicht beeinflußt.

11.) Kollagene Fasern zeigen nur eine schwache PAS-Reaktion. Hyaluronidase hat bei diesen Fasern keinen Einfluß auf den Ausfall der PAS-Reaktion.

12.) Im Granulationsgewebe liegen keine MZ.

Bei dem PAS-positiven Material in den Fibroblasten kann es sich nicht um Lipide oder Glykogen handeln. Diese wären durch die Vorbehandlung (Fixierung und Alkoholreihe) herausgelöst worden, um s MPS handelt es sich ebenfalls nicht, da sich keine sauren Gruppen nachweisen lassen. Offenbar liegen Mukopolysaccharide vor, die mit den angewandten Methoden nicht weiter zu differenzieren sind.

Welche Bedeutung den intrazellulären EH-positiven Granula zukommt, ist nicht eindeutig zu sagen, da sie sich weder durch Hyaluronidase beeinflussen noch mit den übrigen Methoden zur Darstellung bringen lassen.

Das PAS-positive Material zwischen den nicht organisierten Talkumkristallen möchten wir in erster Linie als aus dem Blute stammende Glycoproteide ansprechen.

In der Grundsubstanz des jungen Proliferationsgewebes lassen sich

keine s MPS nachweisen, außer in den beschriebenen Höfen um organisierte Talkumkristalle. Diese enthalten offensichtlich viel s MPS wahrscheinlich zunächst Hyaluronsäure. Zur Erklärung der späteren Resistenz gegen Hyaluronidase sind zwei Möglichkeiten zu erörtern. Die Hyaluronsäure könnte vom Talkum dissoziierende Ionen abfangen und sich dabei so verändern, daß die Substratspezifität für das Ferment aufgehoben wird. Oder es hat sich ein fester MPS-Protein-Komplex gebildet, der ebenfalls durch Hyaluronidase nicht angreifbar ist. In der Grundsubstanz zwischen den kollagenen Fasern tritt Hyaluronsäure auf. Es besteht eine deutliche Beziehung zwischen der Menge der Hyaluronsäure und dem Faserreichtum der Beutelwand. Ein zelluläres Äquivalent für die Hyaluronsäure-Synthese ließ sich mit den angewendeten Methoden nicht erbringen.

Der wechselnde Ausfall der metachromatischen Reaktion ist wohl in erster Linie auf temporäre Entmischungsphänomene zurückzuführen.

Die histochemischen Befunde werden in Tabelle IV chematisch zusammengefaßt.

c) Talkumgranulom

In einer weiteren Untersuchungsreihe wurden den Mäusen 0,5 ml der Talkumsuspension in das subcutane Bindegewebe der Rückenpartie injiziert ohne gleichzeitige Taschenbildung.

α) Makroskopisch ist nach 5 Tagen ein kirschkerngroßer fester Knoten entstanden mit einer basal deutlich erkennbaren Gefäßzeichnung. Die Epidermis über dem Knoten ist intakt. Nach 10 Tagen ist der annähernd gleichgroß gebliebene Knoten auf der Kappe in etwa Stecknadelkopfgröße ulceriert; es entleert sich etwas weißlichgelbe Masse. Die basale Gefäßzeichnung ist verstärkt. Nach 15 Tagen liegt ein von Talkumresten fast gereinigtes Wundgebiet vor.

β) Histologisch findet sich eine viel stärkere entzündliche Reaktion als im Talkumgranulombeutel. Die Veränderungen breiten sich

Tabelle IV

Skizzierte Zusammenfassung der histochemischen Befunde am Proliferationsgewebe.

	Tage									
	2	3	5	10	15	20	25	30	35	40
ZYTOPLASMA der Bindegewebszellen										
PAS positiv:	-	+	++	+++	+++	++++	+++	+++	+++	+++
HALE positiv:	-	-	(+)	+	++	++	++	++	++	++
GRUNDSUBSTANZ:										
a) PAS:	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Kinetin:	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
b) HALE:	-	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Kinetin:	-	-	-	+	+	++	++	++	++	++
c) Toluidin bei pH 3	+	-	+	-	(+)	(+)	(+)	+	+	+
Kinetin:	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	-	+	+
Toluidin bei pH 4	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++
Kinetin:	+	+	+	+	+	+	+	+	++	++
Fasern										
Menge der kollagenen Fasern:	-	-	-	+	+	++	+++	+++	++++	++++
a) PAS:	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
b) HALE:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
c) Toluidin	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)
Menge d. Retikulinfibrillen	(+)	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
a) PAS:	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
b) HALE:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
c) Toluidin:	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

weit in das umgebende Bindegewebe und in das Corium einschließlich Epidermis aus. Nach 10 Tagen ist die Entzündung eitrig-hämorrhagisch, nur nach der Basis durch ein breites membranartiges Granulationsgewebe abgegrenzt. Nach 15 Tagen ist das Talkumdepot fast vollständig entleert. Es ist ein zartes Granulationsgewebe entstanden und eine beginnende Epithelialisierung der Hautwunde an der Oberfläche nachweisbar.

γ) Histochemisch finden sich prinzipiell die gleichen Veränderungen wie beim Talkumgranulombeutel. Die Entmischungsphänomene oder die Demaskierung der s MPS traten an der Übergangszone zwischen Granulationsgewebe und umgebendem lockerem Bindegewebe besonders deutlich hervor.

d) Paraffingranulom

α) Makroskopisch: Die Paraffingranulombeutel zeigten eine weitgehende Übereinstimmung mit den entsprechenden durch Talkum erzeugten, jedoch ist die Gefäßzeichnung deutlich geringer ausgebildet.

β) Histologisch findet sich ein sehr zartes Granulationsgewebe, in dem es nach 10 Tagen noch nicht zur Bildung von kollagenen Fasern gekommen ist, hingegen sind feine kammartig in das Beutellumen hineinragende argyrophile Fibrillen nachweisbar. Später treten in der Wand des Granulombeutels auch kollagene Fasern auf. Das Proliferationsgewebe ist weniger reich an Grundsubstanz als in dem durch Talkum induzierten.

γ) Histochemisch ergaben sich keine neuen Gesichtspunkte. Eine Abkapselung der Paraffintropfen durch s MPS erfolgte nicht.

Das Paraffingranulom wurde nicht weiter verfolgt, da die Reaktion, auf die es uns ankam, im Talkumgranulombeutel besser d.h. deutlicher hervortraten.

- II. Teil -

In mehreren Versuchsreihen wollten wir durch die Verabreichung von lathyrogenen Stoffen eine Modifikation im Proliferationsgewebe des uns als Modell dienenden Talkumgranulombeutels erreichen, um Aufschluß über mögliche Beziehungen zwischen Grundsubstanz und Faserbildung zu gewinnen.

Die Versuchsanordnung ist im einzelnen aus Tabelle III zu entnehmen. An dieser Stelle soll nur auf die Unterschiede im Vergleich zu den Kontrolltieren eingegangen werden.

Bei Mäusen durch tägliche Injektion von 1 mg ß-APN in das subcutane Bindegewebe der Rückenhaut das Granulationsgewebe der Talkumgranulombeutel zu beeinflussen, erwies sich als unzweckmäßig, da sich ausgedehnte Nekrosen einstellen, die zur Sequestration des Granulombeutels führen.

Histologisch findet sich basal d.h. über der Fascie der Rückenmuskulatur ein spärliches Proliferationsgewebe. Vergleiche mit Kontrolltieren läßt dieser Versuch nicht zu. Eine zweite Versuchsreihe, bei der Mäusen täglich, 0,01 mg BAPN/g Körpergewicht in den Beutel injiziert wurde, um das Gift möglichst unmittelbar auf das sich entwickelnde Organisationsgewebe wirken zu lassen, führte ebenfalls nicht zu einem verwertbaren Ergebnis.

Bei anderen Tieren wurde 5 Tage lang 0,5 mg ß-APN pro gr Körpergewicht intraperitoneal injiziert.

α) Makroskopisch: Der Beutel erscheint nach 5 Tagen gegenüber den Kontrollen ein wenig größer. Die basale Membran ist sehr dünn, durchsichtig; der Beutel mit viel seröser Flüssigkeit gefüllt.

β) Histologisch: findet sich ein breites Proliferationsgewebe, dessen Zellen mit ihren zytoplasmatischen Ausläufern diffus in den Raum verteilt sind, nur stellenweise findet sich eine angedeutete Ausrichtung des Proliferationsgewebes zu einer Art von Membran. Die Kapillaren sind auffallend weit und manchmal lakunenartig ausgeweitet. Die Histiocyten und Fibroblasten zeichnen sich durch einen auffallend lockeren großen rundenKern aus. Es treten keine Riesenzellen auf. Zwischen den Talkumkristallen erscheinen nur vereinzelt kurze plumpe argyrophile Fasern. Die eosinophile Grundsubstanz scheint gegenüber denKontrollen vermehrt zu sein.

γ) Histochemisch: Ist eine Vermehrung der durch EH und Alcianblau darstellbaren Substanzen besonders auffallend. Diese sind gegenüber Hyaluronidase empfindlich. Die PAS-Granulierung der Fibroblasten ist reduziert. Im Proliferationsgewebe erscheinen einzelne MZ.

Die Untersuchung der Reaktion beim Paraffingranulombeutel ergibt die gleichen Veränderungen, allerdings etwas weniger akzentuiert als beim Talkumgranulombeutel. Dieser Versuch wurde daher nicht weiter verfolgt.

In den weiteren Versuchsreihen haben wir das gut wasserlösliche ß-APN.HCL benutzt.

In mehreren Vorversuchen wurde ß-APN-HCL in verschiedenen Konzentrationen intraperitoneal appliziert, um diejenige Giftmenge zu ermitteln, die die größte Wirkung auf das Proliferationsgewebe des Talkumgranulombeutels zeigt. Hierbei erwies sich eine Menge von 30 mg ß-APN-HCL als besonders günstig, die täglich bis zu 15 Tagen i.p. injiziert wurde. Auf die Befunde dieser Versuchsreihe soll näher eingegangen werden.

α) Makroskopisch:

Die Granulombeutel dieser Versuchsreihe sind gegenüber den Kontrollen verschieden. Sie sind deutlich größer und besitzen nach 10 bzw. 15 Tagen noch ungefähr die Größe der Beutel von 5 Tage alten Kontrollen. Ihre basale Begrenzung ist auffallend dünn und durchsichtig. Die Beutel sind mit reichlich seröser -später serös-eitriger- Flüssigkeit gefüllt. Die Resorption der Luft scheint nicht verschieden zu sein.

β) Histologisch:

Nach 5 Tagen ist unter dem Talkumbelag ein stärkeres Ödem mit zahlreichen Leukocyten und Zelldetritus nachweisbar. Das anschließende Proliferationsgewebe ist deutlich zellärmer als bei den Kontrollen. Die Histiocyten und Fibro-

blasten haben einen auffallend großen runden oder ovalen Kern, mit einem sehr lockeren Chromatin. Das Zytoplasma ist schmal und schwach basophil. Vereinzelt sind Riesenzellen vom Fremdkörpertyp entstanden. Die eosinophile Grundsubstanz ist gegenüber den Kontrollen vermehrt. Die Kapillaren sind sehr weit, in der Beutelwand erscheinen keine neugebildeten faserigen Elemente. Auch die Talkumkristalle sind nicht von argyrophilen Fibrillen umgeben.

Auch nach 10 Tagen zeigt das Proliferationsgewebe keine Reifungstendenz, es erscheint "jünger" als bei den Kontrollen. Jetzt sind aber vereinzelt junge Bindegewebszellen zwischen den Talkumkristallen, also Zeichen einer beginnenden Organisation, nachzuweisen. Die Beutelwand enthält einige plumpe argyrophile Fibrillen aber keine kollagenen Fasern.
Ein schalenartiger Aufbau des Granulationsgewebes, wie er bei den Kontrollen charakteristisch ist, fehlt völlig. Im Gegensatz zu den Kontrollen besteht eine stärkere Infiltration von Leukocyten. Nach 15 Tagen erscheint ein verhältnismäßig spärlich entwickeltes Granulationsgewebe, das auffallend reich an Riesenzellen ist. Die Talkumkristalle sind jetzt von einem weitmaschigen Netz argyrophiler Fibrillen umsponnen. Das im Vergleich zu den Kontrollen eindeutig grundsubstanzreichere Proliferationsgewebe ist stark leukocytär infiltriert und geht ohne scharfe Grenze in das mit Eiter gefüllte Beutellumen über.

ββ Histochemisch:

Die im Hauptversuch erwiesene Zunahme der PAS-Granulierung in den Fibroblasten, ist eindeutig reduziert, während die Zahl der EH-positiven Granula vermehrt zu sein scheint. Die Grundsubstanz ist deutlich vermehrt, und zwar in erster Linie die PAS-positive Substanz, jedoch sind auch die durch Alcianblau und EH darstellbaren Stoffe deutlich umfangreicher vorhanden. Metachromatisches Material ließ sich

in der Grundsubstanz des Proliferationsgewebes nicht nachweisen. In der Randzone, zwischen Granulombeutelwand und umgebendem Bindegewebe, sind im wesentlichen die gleichen Beobachtungen wie bei den Kontrollen zu machen, sie erscheinen in dieser Versuchsreihe vielleicht etwas ausgeprägter.

C. Besprechung

I.

Mit den Reaktionen der Organismen auf einverleibte Fremdkörper hat sich die experimentelle Pathologie nun schon seit fast 100 Jahren beschäftigt.

1869 stellten J. COHNHEIM und B. FRÄNKEL als erste derartige Versuche an, indem sie Tieren kleine Fremdkörper in die Bauchhöhle einbrachten und die Bildung von Fremdkörperriesenzellen beobachteten. Seit dieser Zeit haben sich unzählige Arbeiten mit dem histologischen, histochemischen und elektronenmikroskopischen Aufbau und der Dynamik der durch Fremdkörper induzierten Reaktionsprodukte von Organisationsgewebe beschäftigt.

Auch das Talkumgranulom ist von vielen Autoren untersucht und beschrieben worden (ANTOPOL, RÖSSLE , KNÖFLER, ZÜLLIG u.a.). Das Talkumgranulom fand deswegen lange Zeit ein besonderes Interesse, weil es im Zusammenhang mit der Anwendung von Talkumpuder als Handschuhgleitmittel in der Chirurgie und Gynäkologie zu unerwünschten Folgen gekommen war.

Es ist seit langem bekannt, daß auch die ortsständigen Bindegewebszellen im lockeren Bindegewebe die Fähigkeit haben (oder binnen kurzer Zeit diese Funktion wiedererlangen können) kleine anorganische Fremdkörper zu phagocytieren. Größere unlösliche Fremdkörper verursachen zunächst eine unspezifische entzündliche Reaktion. Es entwickelt sich dann ein Organisationsgewebe, das sich im weiteren Verlauf in ein mehr oder weniger grundsubstanz- und faserreiches Narbengewebe umwandelt. Auf diese Weise werden nicht resorbierbare Fremdkörper abgekapselt.

An unserem Modell konnte die Dynamik und der charakteristische vorübergehende schalenartige Aufbau des entstehenden Bindegewebes deutlich gezeigt werden.

Von den "ruhenden" Bindegewebszellen geht die Bildung dieses proliferierenden Gewebes aus.

Es muß also von den Fremdkörpern irgendein die Proliferation anregender Reiz ausgehen. Früher nahm man einen rein mechanischen Effekt beim Fremdkörper an. Diese Annahme ist zumindest im Hinblick auf das Talkum unzutreffend. Dieses Mineral ist praktisch unlöslich in Wasser. Es ist aber dennoch anzunehmen, daß in geringem Maße SiO_2-Ionen von den Kristallen dissoziieren und durch eine Irritation des Zellstoffwechsels der Bindegewebszellen eine Zellproliferation induzieren. Aus der Silikoseforschung (HELLMERS und UTHOFF; SIEGMUND) ist bekannt, das kolloidale Kieselsäure eine fibrogene Wirkung hat. SCHEEL und Mitarbeiter diskutieren einen anderen Gesichtspunkt. Danach sollen die Talkumkristalle an ihrer Oberfläche körpereigene Proteine adsorbieren, die auf diese Weise so verändert werden, daß sie den Organismus zu einer Antikörperbildung stimulieren.

Diese beiden pathogenetischen Vorstellungen erlangen -wenn überhaupt- sicher erst im Ablauf der Granulombildung eine gewisse Bedeutung. Zunächst dürfte durch das Einbringen der Fremdkörper -wie schon eingangs erwähnt- die Eukolloidalität der Interzellularsubstanz und damit das funktionelle System Zelle-Grundsubstanz gestört werden. Nach Untersuchungen, besonders von SCHADE, kann wahrscheinlich schon dieser Vorgang allein zu einer Aktivierung des Zellstoffwechsels der Bindegewebszellen führen. Diese Aktivierung wird dann durch die Störfaktoren, die vom Fremdkörper selbst ausgehen, unterstützt und unterhalten.

Wie unsere Untersuchungen zeigen, kommt es dabei zu einer gesteigerten Produktion von MPS, die für die ganze Beobachtungszeit anhält. Mit zunehmender Abkapselung des Granulombeutels nimmt die MPS-Synthese allerdings ab. Diese Befunde stimmen mit den histochemischen Ergebnissen am Paraffingranulom (ARAMBĂSIC) und an sekundär heilenden Wunden (TROTT und SEIKOFF) überein.

Nach Untersuchungen mit radioaktivem Schwefel (S^{35}) (BÖRSTROM, HAUS und JUNGE-HÜLSING) ist die Sulfatfixierung im entzündlich veränderten Bindegewebe erhöht und die biologische Halbwertzeit verkürzt.

Es ist aber vorläufig nicht zu entscheiden, ob es bei der Acceleration des Mesenchymstoffwechsels auch zu einer vermehrten Ablagerung von s MPS in das Gewebe kommt.

Umfangreiche Untersuchungen von GEDIGK und Mitarbeitern haben ergeben, daß es bei der Reaktion der Bindegewebszellen auf Fremdkörper zu einer Produktion und Ablagerung von s MPS kommt.

Bei den breiten EH-positiven Höfen um Talkumkristalle in unseren Granulombeuteln, dürfte es sich auch um s MPS handeln, und zwar wahrscheinlich um Hyaluronsäure, da die Substanz durch Hyaluronidase wenigstens anfänglich zerstörbar ist. Diese Feststellung allein würde unsere Annahmen nicht rechtfertigen, zumal nach Untersuchungen von HOUCK und PEARSE Hyaluronidase aus Rinderhoden (das von uns benutzte Kinetin ist ein solches Ferment) sowohl Hyaluronsäure als auch Chondroitinschwefelsäure durch Hydrolyse der ß-Hexosamin-Bindung in beiden Substraten depolymerisiert. Ferner ist nach diesen Untersuchungen die Aktivität der Hyaluronidase gegenüber beiden Substraten gleich groß. Wenn es sich bei der Substanz um Chondroitinschwefelsäure gehandelt hätte, müßte sich wegen der anionischen Sulfatgruppen eine deutliche metachromatische Reaktion eingestellt haben. Dies ist aber eindeutig bei verschiedenen pH-Werten nicht der Fall, weshalb per exculusionem unsere Annahme berechtigt erscheint.

Auf den ersten Blick ist es merkwürdig, daß die Reaktion der Zellen in der Produktion s MPS besteht. Eine reaktive Bildung von s MPS auf basische Fremdkörper wäre eher verständlich. Bei dem von uns verwendeten Talkum handelt es sich zwar um ein basisches Mg-Silikat, bei den dissoziierenden Ionen aber um die elektrisch negativ geladenen SiO_2-Ionen. Untersuchungen von HOLZAPFEL haben nun Anhaltspunkte für die Reaktionsfähigkeit von Kieselsäure mit den s MPS ergeben. Es konnte gezeigt werden, daß die Kieselsäure in mehrfacher Hinsicht mit den s MPS in Wechselbeziehung treten kann. Und zwar vermag sie mit allen Hydroxyl-Gruppen des Kohlenhydratskelettes, die keine sterischen

Behinderungen zeigen, unter Ester-Bindung zu reagieren.

Aus diesen Untersuchungen kann eine weitere Stütze für unsere Annahme über die chemische Natur der EH-positiven Substanz in den Höfen hergeleitet werden. Denn die anionischen Sulfat-Gruppen der Chondroitinschwefelsäure würden die ebenfalls elektrisch negativ geladenen SiO_2-Ionen abstoßen. Man kann sich daher nur schwer das Zustandekommen einer Ester-Bindung in der unmittelbaren Nachbarschaft von elektrischen gleichgeladenen Gruppen vorstellen, die sich zudem noch ohne Energiezufuhr im Interzellularraum vollziehen soll. Im Gegensatz dazu besitzt die Hyaluronsäure genügend nicht behinderte Hydroxyl-Gruppen.
Zur Erklärung des zunächst überraschenden Befundes, daß das EH-positive Material um die Talkumkristalle nach ca. 10 Tagen gegen Hyaluronidase resistent wird, können zwei Möglichkeiten angeführt werden. Entweder wird durch die Veresterung der Hyaluronsäure mit SiO_2-Ionen oder durch eine Adsorption an das Talkum die Substanz so verändert, daß die Substratspezifität für die Hyaluronidase aufgehoben ist, oder es kann durch einen Antigen -Antikörper-Mechanismus im Sinne der von SCHEEL diskutierten Möglichkeit nach 10 Tagen zur Präzipitation eines Eiweißkörpers und zur Bildung eines unangreifbaren s MPS-Protein-Komplexes gekommen sein.

Der "Schutzmantel" aus Hyaluronsäure um die Talkumkristalle könnte die Funktion einer Isolierungsschicht haben, die ein weiteres Ausbreiten von langsam dissoziierenden Ionen verhindern soll.

Mit unseren im Zeitreihenversuch durchgeführten Untersuchungen wollten wir auch Aufschlüsse über die Dynamik der Grundsubstanz- und Faserbildung gewinnen, die wahrscheinlich miteinander gekoppelt sind.

Die PAS-Granulierung der Fibroblasten wird von GERSCH und CATSCHPOLE, TAYLOR und SAUNDERS, JACKSON als ein Zeichen der MPS-Synthese gewertet.

Die Bildung von MPS durch Fibroblasten ist auch in Gewebekulturen bewiesen. Es hat sich gezeigt, daß nach dem Auftreten zahlreicher PAS-Granula in den Fibroblasten auch im Organisationsgewebe stark PAS-positive argyrophile Fibrillen zu finden sind. Gleiche Befunde hat WILLIAMS am Carrageenin Granulom erhoben.

Die PAS-Reaktion der Retikulinfibrillen ist ebenso kräftig wie die der Granula in den Fibroblasten, während kollagene Fasern nur eine schwache PAS-Reaktion zeigen. Extrazelluläre Granula finden sich nur selten, vermutlich verteilen sich die in den Granula konzentrierten Stoffe nach ihrer Extrusion gleichmäßig im Interzellularraum. Auf diese Weise ließe sich der deutlich schwächere Ausfall der PAS-Reaktion in der Grundsubstanz am ehesten erklären. Es ist aber auch möglich, daß sich diese Substanzen an der Oberfläche der Retikulinfaser konzentrieren und mit den Fasereiweißen eine feste Bindung eingehen. Chemisch könnte diese Substanz aus Chondroitinschwefelsäure bestehen. Über die Beziehung zwischen Chondroitin und Faserbildung wird bei der Erörterung des Lathyrismus noch zu sprechen sein.

Ob die PAS-positive Reaktion der Interzellularsubstanz in erster Linie auf neugebildete MPS zurückzuführen ist, erscheint uns fraglich. Denn schon früh zeigt sich eine Durchtränkung der Beutelwand mit schwach PAS-positiven Substanzen, ohne daß sich dafür ein Äquivalent in den Fibroblasten finden ließe. Es wird sich daher wohl um Glucoproteide aus dem Plasma handeln, die das Entzündungsfeld durchtränken.

Bemerkenswert ist die Tatsache, daß die in der Literatur (Handbuch für Histochemie Bd. Kohlenhydrate GRAUMANN) häufig beschriebene metachromatische Reaktion im Proliferationsgewebe bei unseren Experimenten nur sehr schwach ausfällt, manchmal sogar überhaupt nicht nachzuweisen ist. Bei einem 3 4 Stunden alten GB zeigt sich eine schmale metachromatische Zone an der inneren Beutelbegrenzung. Diese Beobachtung kann mit der Annahme erklärt werden, daß es sich um ein sogenanntes Entmischungsphänomen handelt (LINDNER). Durch den gesetzten Reiz kommt es

offenbar bei der folgenden entzündlichen Reaktion zu einer Lösung des MPS-Protein-Komplexes in der Grundsubstanz. Auf diese Weise könnten Sulfatgruppen demaskiert werden und als freie anionische Gruppen mit dem Toluidin reagieren. Auf dieselbe Weise ließe sich die Metachromasie im Bereich von Nekrosen und Nekrobiosen im Proliferationsgewebe erklären. Diese Beobachtung legt die Annahme nahe, daß auch in der Grundsubstanz des Proliferationsgewebes die metachromatisch reagierende Substanz, vielleicht maskiert, vorhanden ist.

Für die besonders von ASBOE-HANSEN vertretene Ansicht, daß den Mastzellen eine entscheidende Rolle bei der Bildung der Grundsubstanz zukommt, ergibt sich in unseren Untersuchungen kein Hinweis, in allen unseren Experimenten können nämlich im Organisationsgewebe nie MZ nachgewiesen werden.

In der normalen Mäusehaut finden sich hingegen zahlreiche MZ. Diese lassen sich durch Toluidin bei verschiedenem pH-Wert darstellen. Die Mastzellen sind voll gepackt mit plumpen purpurroten Körnchen. Der Zellkern ist dabei meist nicht zu erkennen. Durch EH werden nur einzelne Granula darstellbar. PAS-positive Granula sind nur spärlich vorhanden. Die Granulierung der MZ ist nicht hyaluronidase-empfindlich.

Ob es sich bei den mit den verschiedenen Methoden dargestellten Granula um grundsätzlich verschiedene Stoffe handelt, oder ob sie Vorstufen der Synthese des Heparin sind, kann mit unseren Methoden nicht entschieden werden. Für die letztere Annahme spricht jedoch die Tatsache, daß in der Umgebung von MZ nur metachromatische Granula gefunden werden. Auch durch chemische Überlegungen kann diese Hypothese gestützt werden. Wie in der Einleitung erwähnt, wird der metachromatische Farbumschlag durch anionische Gruppen im Abstand von 5-6 Å bewirkt. Wie biochemische Untersuchungen zeigen, wird bei der MPS-synthese zuerst das Chondroitin polymerisiert und dann durch aktiviertes Sulfat in den Seitengruppen verestert (ADAMS). Die Vorstufen der Heparin-

synthese haben daher noch freie Hydroxyl- und Carboxylgruppen, die mit EH und PAS erfaßt werden können.

Da die MZ einfach und sicher zu registrieren sind, haben wir die gelungene Darstellung der MZ als Indikator für die technische Güte unserer Präparate benutzt.

Das feine EH-positive Netz zwischen den Fasern und Fibrillen sowohl im präexistenten Bindegewebe als auch im älteren Granulationsgewebe enthält Hyaluronsäure . Die netzige Struktur ist durch Fixierungseinflüsse bedingt. Hyaluronsäure tritt im Granulationsgewebe sicher vermehrt auf. Zwischen Faserreichtum und Hyaluronsäuremenge besteht wahrscheinlich eine Beziehung, denn es läßt sich im faserreichen Granulationsgewebe mehr Hyaluronsäure nachweisen als im präexistenten Bindegewebe.

Nach Untersuchungen von K. MEYER hat die nur sehr locker an Proteine gebundene Hyaluronsäure eine Funktion im Wasserhaushalt des Interzellularraumes. Sie stellt den Hauptbestandteil der Grundsubstanz dar. Die Chondroitinschwefelsäure ist fest an Proteine gebunden und steht in einem innigen Kontakt mit der Fibrillogenese.

Die von VIRCHOW als Mucin bezeichnete Substanz stellt nach den heutigen Kenntnissen einen MPS-Protein-Komplex dar, der als Kohlenhydratkomponente in erster Linie Hyaluronsäure enthält.

II.

Die Granulombeutel bei den mit ß-APN behandelten Tieren zeigen gegenüber den Kontrollen histologisch und histochemisch mehr quantitative als qualitative Unterschiede. Die Ergebnisse anderer Arbeiten, die sich ebenfalls mit der Wirkung vom ß-APN auf das Granulationsgewebe beschäftigen (zit. aaO), stimmen mit unseren Beobachtungen überein. Nach ß-APN reift das Granulationsgewebe nur langsam aus, die Fibrillogenese ist verzögert.

Bei unseren Untersuchungen entspricht die verminderte PAS-Granulierung der Fibroblasten der Reduzierung der argyrophilen Fasern im Organisationsgewebe. Hyaluronsäure tritt dagegen vermehrt auf. Diese Befunde können die Hypothese stützen, daß der Lathyrismus seine Ursache in einer Blockierung bestimmter Schritte der Mukopolysaccharidsynthese hat.

Kollagene Fasern enthalten bekanntlich Kohlenhydrate. Es wird vermutet, daß diese Kohlenhydrate als cross-link zwischen den Aminosäureketten des Kollagenmoleküls einerseits und als Matrix beim Zusammenlagern der Moleküle zu Fasern andererseits funktionieren (HÖRMANN). Nach in-vitro-Versuchen ist die charakteristische Querstreifung der kollagenen Fasern (640 Å) unabhängig von der Kohlenhydratkomponente, dagegen hängt die Dicke von den s MPS ab (KÜHN, GRAßMANN, HOFMANN). In diesem Zusammenhang sind Arbeiten, die von einem Anstieg des mit neutraler Salzlösung extrahierbaren Kollagens berichten von Interesse (LEVENE und GROSS). Genaue Untersuchungen von GROSS erbrachten keinen Hinweis dafür, daß das ß-APN an Kollagenmoleküle gebunden wird.

Die Angaben in der Literatur, die den Hexosamingehalt der Grundsubstanz bei lathyrogener Veränderungen zum Gegenstand haben, sind zum Teil widersprechend (HARTMANN und SEIFERT). Diese Widersprüche scheinen zu einem Teil methodisch bedingt zu sein. KARNOVSKY und Mitarbeiter fanden in ihren Untersuchungen am Epiphysenknorpel keinen signifikanten Wechsel im Hydroxyprolin- und Hexosamingehalt, sie stellten aber histochemisch verstärkte Farbreaktionen für MPS und einen merkbaren Anstieg des Wassergehaltes fest. Diese Ergebnisse lassen sich gut mit unseren Beobachtungen in Einklang bringen.

Durch das ß-APN wird die Synthese der Kittsubstanz oder mukopolysaccharidhaltigen Matrix gestört, die für die Fibrillen und Faserbildung nötig ist. Es muß angenommen werden, daß ß-APN über eine kompetitive Hemmung eines Enzyms die MPS-synthese erschwert, denn es zeigt sich nur eine Verzögerung aber keine Blockierung der Faserbildung.

Nach dem histochemischen Befund ist die Hyaluronsäurekonzentration nicht vermindert, sondern sogar gesteigert, ein Befund, der einen größeren Wassergehalt im Gewebe ß-APN vergifteter Tiere durchaus erklären könnte.

Es ist nicht genau bekannt, welche Struktur das Mukopolysaccharid besitzt, das bei der Faserbildung eine wichtige Funktion hat. Es spricht jedoch eine Vielzahl von Befunden dafür, daß es sich um eine hochpolymere Chondroitinschwefelsäure handelt. Auf welche Weise dieses hochpolymere saure Mukopolysaccharid in die Kondensation von Tropokollagen eingreift, ist ebenfalls unbekannt (HARTMANN). Da die bi-molekularen Grundeinheiten von Hyaluronsäure und Chondroitinschwefelsäure sich nur in einem ihrer beiden Zucker unterscheiden , haben sie bezüglich ihrer Grundbausteine einen sehr ähnlichen, teilweise gemeinsamen Syntheseweg. Gemeinsam ist ihnen die Glucuronsäure. Sie unterscheiden sich in ihrem Hexosaminbestandteil, der zwar in beiden Molekülen ein Acetylhexosamin ist, das sich aber in der sterischen Konfiguration des Kohlenhydratskelettes anders verhält. Die zugänglichen Arbeiten haben auf diesen Unterschied offenbar nicht geachtet, da sie den Hexosaminbestandteil als Charakteristikum für die Mukopolysaccharide erfaßten.

Durch die Annahme eines spezifischen "Enzymblockes" in der Galaktosamin-Synthese, wobei es sich allerdings nicht um einen vollständigen Block, sondern um eine kompetitive Hemmung des Enzyms handeln müßte, wäre die verzögerte Faserbildung zu erklären. Man kann sich ferner vorstellen, daß die sich deshalb anhäufende Vorstufen teilweise auf den Synthesenweg der Hyaluronsäure umgeleitet werden, eine Vorstellung, die bei den, den Stoffwechsel der Zellen regulierenden Fließgleichgewichten durchaus verständlich wäre. Unsere Beobachtung , daß die Hyaluronsäure im Granulationsgewebe der durch ß-APN vergifteten Albinomäusen vermehrt ist, könnte durch diese Hypothese erklärt werden.

D. Zusammenfassung

Bei 100 weißen Mäusen sind Fremdkörpergranulome erzeugt worden, vorzugsweise Talkumgranulombeutel (Lufttaschen-Technik nach SELYE). Im Zeitreihenversuch ist histologisch und histochemisch die Grundsubstanz und Faserbildung in diesem Proliferationsgewebe verfolgt worden. Es zeigt sich, daß die Reaktion des Organismus auf die Irritation in vier Schritten abläuft, wie es aus allgemeinpathologischen Überlegungen zu erwarten war. Dabei werden die Talkumkristalle durch eine chronische bindegewebsbildende Entzündung abgekapselt, nach ungefähr 40 Tagen ist die Bindegewebsneubildung im wesentlichen abgeschlossen.

In 3 Tage alten Granulombeuteln erscheinen PAS-positive Granula in den Fibroblasten. Die PAS-Granulierung steigt rasch an und wird nach dem 25. Tag langsam geringer. Es sind bis zum Ende der Versuchszeit PAS-Granula in den Fibroblasten nachweisbar. Die PAS-Granulierung wird als Zeichen der Produktion von Mukopolysacchariden gewertet.

Die nicht von Riesenzellen umschlossenen Talkumkristalle sind in eine amorphe Substanz eingebettet, die mit der Eisenadsorptions-Färbung nach HALE darstellbar ist. Es handelt sich bei dieser Substanz wahrscheinlich um Hyaluronsäure.

Metachromatische Substanzen sind im Proliferationsgewebe nur undeutlich und vorübergehend nachweisbar. Mastzellen erscheinen nicht im Proliferationsgewebe. Sie können also bei der Grundsubstanzbildung keine Bedeutung haben.

Die Unterschiede zwischen den ß-APN-behandelten Tieren und den Kontrollen sind eher quantitativer als qualitativer Art. Das Granulationsgewebe bei den mit ß-APN behandelten Tieren erscheint "jünger" als bei den Kontrollen. Die PAS-Granulierung ist deutlich reduziert. Die Hyaluronsäure hingegen ist nicht eindeutig vermindert.
Eine kompetitive Hemmung eines Enzym der Galaktosaminsynthese durch ß-APN könnte diese Befunde verständlich machen.

E. Literatur

ADAMS, J.: Biosynthesis of chondroitin sulfate Nature (London) 184,274, (1959)

ANTOPOL: A.M.A.Arch.Path. 16, 326 (1933)

ARAMBASIÇ M.: Histologische und histochemische Untersuchungen des Paraffingranuloms. Frankfurt Z.Path. 71, 327-333 (1961)

ASBOE-HANSEN,G.: Connective Tissue in Health and Disease. Munksgaard,Copenhagen (1954)

BELANGER, L.F.: Autoradiographic studies of sulfated mucopolysaccharides metabolism in cartilage of osteolathyric rats and chick Proc.Soc.exp.Bio.Med. 99,605 (1958)

BOSTROEM, H.: Einige Aspekte zum Metabolismus der der Mukopolysaccharide.Struktur und Stoffwechsel. II.Symposion der Med. Univ.Klinik Münster (Westf.) H.W. Hauss und H.Losse S.20-33,Stuttgart, Beorg Thieme(1960)

BUDDECKE,E.: Untersuchungen zur Chemie der Arterienwand Hoppe-Seylers Z.physiol.Chemie 310, 171-182 (1958)

BUDDECKE,E.: Chemie und Stoffwechsel der Grundsubstanz des Bindegewebes. Beitr. Silikose-Forsch. S-Bd.Grundfragen Silikoseforsch. Bd. 4, 291-309 (1960)

BÜCHNER, F.: Allgemeine Pathologie.Urban und Schwarzenberg, München-Berlin (1962)

BEAMER, P.R.: im Principles of Human Pathologie (Smith, E.B.F.Vellios, D.M.Schulz, New York, Oxford University Press 1959

CASTELLANI,H. und C.CASTELLANI-BISI: Decrease in hexosamine content of epiphyseal plates in experimental lathyrus Proc.Soc.exp.Bio.Med.98, 319 (1958)

COHNHEIM,J. u. FRÄNKEL,B.: Virchows Arch.path.Anat. 45 (1869) zit. nach WURM,E.

CURRAN, R.C.: The elaboration of mucopolysaccharides by vascular endothelium.J.Path.Bact. 74, 357 (1957)

DASSLER: Isolation of toxic crystals from sweet peas (lathyrus odoratus)Science, 120, 307 (1954)

DASSLER, Stoner and MILLISER: Effect of osteolathrism on solible collagen fraction of rat connective tissue. Metabolism 10, 883, (1961)

DETTMER, N.: Entwicklung und räumliche Anordnung der Interzellularsubstanz des Bindegewebes .Beitr. Silikose-Forsch, S-Bd.Grundfragen Silikoseforsch.Bd.1 185 (1955)

DOERR, W.: Experimentelle Mesenchymschäden durch Lathyrus odoratus Langenbecks Arch. klin.Chirurg. 294, 426-449, (1960)

DORFMAN, A .: Polysaccharides of connectiv tissue. J. Histochem.Cytochem. 11, (1963)

DURAN-REYNALS: Alte und neue Erkenntnisse über die mesenchymale Grundsubstanz.Medizinische (1954) Nr. 16-17, 532

ENZINGER, F.M. and WARNER, E.D.: Wound Healing in Experimental Lathyrism.Lab.Invest 6, 251, (1957)

ENZINGER, F.M. and WARNER, E.D.: Effect of Aminoacetonitril in Connective Tissue Formation in Adult Rats. Arch.Path. 69, 333 (1960)

EHRLICH: Handbuch Allg.Pathologie, Bd. VI Reaktionen

FITTON-JACKSON,S.: Studies on biosynthesis of collagen. J. biophys.biochem.Cytol. 3, 897-912 (1957)

FLOREY, H.: General Pathologie, 3 rd Ed. (1962)

GEDIGK, P.: Histochemische Darstellung von Kohlenhydraten. Klin.Wschr. 30, 1057 (1952)

GEDIGK, P. und PIOCH,W.: Über die Bildung organischer Substanz im SiO_2-Granulomen.Virchow Arch.path.Anat. 328, 513-535 (1956)

GEDIGK, P. und PIOCH,W.: Über die Speicherung von Schwermetallverbindungen in mesenchymalen Geweben. Beitr.path.Anat. 116, 124-148 (1956)

GERSH, J. und CATCHPOLE, H.R.:	The organisation of ground substance and basement membrane and its significence in tissue injury, disease and growth. Amer.J.Anat. 85, 457-521 (1949)
GRAUMANN, W.:	Vergleichende Untersuchungen zur Frage der Spezifität verschiedener Modifikationen der Polysaccharid-Eisenreaktion Acta histochem.(Jena) 5, 49-61, (1957)
GRAUMANN, W.:	Handbuch d.Histochemie Bd. II/2, Polysaccharide,Stuttgart,Gustav Fischer 1964
HARTMANN, Fr. und SEIFERT, K.:	Klin.Wrsch. 40, 1156 (1962) Hexosaminbestimmung bei experimentellem Lathyrismus.
HARTMANN, Fr.:	Experimenteller Lathyrismus Z.Zellforsch. 59, 358, (1963)
HARTMANN, F.:	Die biochemischen und makromolekularen Grundlagen einer Pathologie der Bindegewebe Internist. 2, 403 (1961)
HARTMANN, F.:	Neuere Ergebnisse der Bindegewebsforschung Z. Rheumaforschung 17, Nr. 11/12 (1958)
HAUSS,H.W. und JUNGE-HÜLSING, G.:	Über Veränderungen des Sulfatmukopolysaccharidstoffwechsels im Bindegewebe unter Einwirkung von Infektion und Sensibilisierung Z.Rheumaforsch. 19, Nr. 5/6 (1960)
HAUSS, H.W. und JUNGE-HÜLSING, G.:	Über die universelle unspezifische Mesenchymreaktion. Dtsch.med.Wschr. 16, 763-768 (1961)
HELLMERS, J.H. und ÜTLUFT, H.:	Jahrbuch Preuß.geol.Landesanstalt 50, 751 (1938)
HOLZAPFEL:	Die Staublungenerkrankungen Bd. 2, Dietrich Steinkopf, Darmstadt 1954
HOUCK, J. and A.G.E. PEARSE:	The mechanism of hyaluronidase actior Biochim.Biophy.Acta 25, 555-562 (1957)
HÖRMANN, H.:	Die Kohlenhydrate des Bindegewebes Beitr.Silikose-Forschung S-Bd.Grund-

HÖRMANN, H.: (Forts. S. 43) fragen Silikose-forsch. Bd. II (1956)

HURLEY, J.V. and HAM, K.: The nature of connective tissue defect produced by aminonitriles. Britsh.J. exp. Path. 40, Nr. 3 (1959)

HURLEY, J.V., HAM, K. and STOREY, E.: The effect of aminoacetonitriles and cortisone on healing of terpentine induced abscesses in the rat. Britsh.J.exp.Path. 39, Nr. 2, 1958

JACKSON,S.F.: Cytoplasmic granules in fibrogenic cells. Nature (London) 175, 39 (1955)

HALE,A.J.: The histochemistry of polysaccharides Int.Rev.Cytol. 6, 199-263 (1957)

JACKSON, D.S.,FLICKINGER D.B. and DUNPHY, J.E.: Biochemical studies of connective tissue repair. Ann. N.Y.Acad.Sci 86, 4, 943-947 (1960)

JUNGE-HÜLSING,G.: Über den Stoffwechsel von Sulfomukopolysacchariden im Granulationsgewebe. Z.Rheumaforschg. 18, 355-367 (1959)

KARNOVSKY,M. and M.I. KARNOVSKY: Metabolic effects of lathyrogenic agents on cartilage in vivo and vitro J.exp.Med. 113, 381, (1961

KNÖFLER,W.E.: Das Talkumgranulom Zbl.ChirurgieBd. 88/4, 1893 (1963)

KRIKOS, G.A. and ORBISON, J.L.: Histochemical studies of skin wounds in rats receiving beta-aminopropionitrile. Arch.Path. 70, 188-194 (1960)

KRIKOS, G.A. and ORBISON, J.L.: Effect of beta-aminopropionitrile upon wound healing Arch.Path. 65, 312 (1958)

KÜHN,K.,HOFMANN,U. and GRASSMANN,W.: Über die Verteilung der basischen Aminosäuren in der Tropokollagenmolekel Naturwiss. 46, 512 (1959)

LEVENE,C.J.: Studies on the mode of action of lathyrogenic compounds. J.exp.Med. 116, 119 (1962)

LEVENE,G.J. and J.GROSS: Alteration in state of molecular aggregation of collagen induced in chick embryos by beta-aminopropionitrile (lathyrus factor) J.exp.Med.110 771 (1959)

LETTERER, E.: Allgemeine Pathologie
Georg Thieme, Stuttgart 1959

LEWIS and SCHULERT: Experimental lathyrism in white rat and mouse Proc.Soc.exp.Bio.Med. 71, 440 (1949)

LILLIE, R.D.: Histochemistry of connective tissue Laborat.Invest 1, 30-45 (1952)

LINDNER, J.: Histologische, histochemische und papierchromatographische Untersuchungen der Entzündung unter dem Einfluß von Antiphlogistika.Acta histochem. (Jena) 7, 1-20 (1959)

MASSHOFF,W., GRANER,W. u. HELLMANN, H.: Experimentelle Untersuchungen über Transsudat und Exsudat.Virchows Arch.Path.Anat. 317, 114-135 (1949)

McMANUS, J.F.A.: Histochemical demonstration of mucin after periodic acid.Nature (London) 158, 203-223 (1946)

McMANUS, J.F.A.: The periodic acid routine applied to the kidney.Amer.Path. 24, 643-653 (1958)

McCALLUM: Lathyrism in mice.Nature (London) 182, 1169 (1958)

MEYER, K.: The mucopolysaccharides of the interfibrillar substance of the mesenchym Ann. N.Y.Akad.Sci 52, 943 (1950)

MEYER, K. und RAPPORT,M.: The mucopolysaccharides of the ground substance of connective tissue. Science. 113, 596-599 (1951)

MÜLLER, G.: Über die Vereinfachung der Reaktion nach HALE. Acta histochem.(Jena) 2, 68-70 (1955)

MÜLLER, G.: Die Darstellung der sauren Mucopolysaccharide durch Toluidin-Metachromasie, die Alcianfärbung, die PAS-Reaktion und die Ferrihydroxylsol-PAS-Reaktion.Acta Histochem. (Jena) 6, 212-224 (1959)

ORLOFF, D. and GROSS,J.: Experimental lathyrism in the chick embryo.The distribution of ß-aminopoprionitrile.J.exp.Med. 117,1009 (1963)

PETERSEN, H.: Osteolathyrism in mice and its modification by strain age and diet. Exp.Med.Surg. XX, 71, 267, (1962)

PONSETI, I.V.: Further studies on lathyrism in the rat Pro.Soc.exp.Bio.Med. 92, 366 (1956)

PORTER, K.R.: Repair processes in connective tissue:Connective tissue.Edit by Ch.Ragans 126-158 (2nd J.Macy Found) New York (1952)

PORTER,K.R. and PAPPAS, G.D.: Collagen formation by fibroblasts of chick embryo dermis.J.biophy. biochem Cytol.5, 153-165 (1959)

RIZZOLI,C.: Le basi istochimiche della coloratzione dei mucopolisaccaridi nei tessuti con il blu alcian 8GN .Boll.Soc. ital.Biol.sper. 31, 422-425 (1955)

RIZZOLI,C.: Ricerche sulla natura e distribuzione dei mucopolisaccaridi nei tessuti animali Rev.Istochem 1, 345-382 (1955)

RÖSSLE , R.: Talkumgranulome aus chirurgischen Handschuhen. Sitzungsber.Ges.Path. Univ.Berlin 24.11.1948 Zbl.Path. 85, 225 (1949)

SCHADE,H.: Molekularpathologie der Entzündung Verh.dtsch.path.Ges. 19.Tgg.1923

SCHALLOCK,G.: Chronische Folgen traumatischer Schädigungen an den Fasern und Grundsubstanzen des Bindegewebes. Verh. dtsch.path.Ges. 39, 12-26 (1959)

SCHALLOCK,G. und H.SCHMIDT-MATTHIESEN: Experimentelle Untersuchungen über die Viskositätsänderungen der Grundsubstanz. Verh.dtsch.path.Ges. 39, 168-174 (1959)

SCHALLOCK, G. und LINDNER, H.: Beitrag zur Frage der Entmischungszustände in der Grundsubstanz des Bindegewebes. Medizinische 1957 12-20.

SCHEIBE, G. und ZANKER, V.:	Physiko-chemische Grundlagen der Metachromasie Acta histochem. (Jena) suppl.1, 6-35 (1958)
SCHEEL,L.G.,J.van RIEPER, P.SMITH and FLEISCHER,F.:	Amerc.Arch.Indust.Hyg.9, 29 (1954 (zit. nach KNÖFLER).
SCHMIDT-MATTHIESEN,H.:	Ein Beitrag zur Bewertung der histochemischen Beweismetnoden für saure Mukopolysaccharide.Acta Histochem.(Jena) 4 , 102 (1957)
SCHMIDT-MATTHIESEN,H.:	Siliciumdioxyd und die reaktive Entstehung von Bindegewebe. Virchows Arch.path.Anat. 327, 419 (1955)
SELYE,H.:	Use of "Granuloma Pouch"-Technic in the study of antiphlogistic corticoides. Proc.Soc.exp.Bio.Med. 82, 328 (1953)
SIEGMUND,H.:	Über die Entstehungsbedingungen silikotischer Schwielen und ihre Erzeuggung im Tierversuch. Verh.dtsch. path.Ges. 27, 262-271 (1937)
SCHUBERT,M.:	Intercellular macromolecules containing polysaccharides in Connective Tissue: Intercellular mecromolecules J.& A. Churchill, London 1964
STEEDMANN,:	Alcian blue.Quart.J.Micros,Sc.91, 477 (1950)
TAYLOR,H.E. and SAUNDERS, A.M.:	The association of granulation tissue ground substance with fibroblastic activity. Amer.J.Path. 32, 617, um 1956
TAYLOR, H.E. and SAUNDER:	The association of metachromatic ground substance with fibroblastic activity in granulation tissue. Amer.J.Path. 33, 525-538 (1957)
TROTT,I.R. and PEIKOFF, M.D.:	A histochemical study of glycogen in the epithelium of wounds healing by secound intension in the abdomen of mice. J.Histochem.Cytochem.11, Nr. 5 (1963)
VEITH,G. und OTTO,H.:	Zur Histologie der kollagenen Fasern Verh.dtsch.path.Ges. 37 254-258 (1953)

VIRCHOW,R.: Cellularpathologie 4. Auflage August Hirschwald, Berlin 1871

WASSERMANN,F.: The interfibrillar components of connective tissue: origin,structure, and interrelationship of fibers and ground substance. Erg.Anat.Entwickl. gesch. 35, 240 - 333 (1956)

WASSERMANN,F.: Electron microscope study of the submicroscopic network of fibrils as a component of connective tissue. Anar.Rec. 111, 145-170 (1951)

WILLIAMS,J.: A histological study of the connective tissue reaction to carrageenin. J.path.Bact. 73, 557 (1957)

WURM,E.: Über die Entstehung der Fremdkörperriesenzellen. Beitr.path.Anat. 116, 149 (1956)

ZEIGER,K. u. SCHIEBLER T.H.: Metachromasie, Fixierung und Artefaktbildung. Acta histochem.Suppl. bd. 1,176 - 204, Fischer Verlag Jena, 1958

ZÜLLIG, A.M.: Talkum- und Stärkegranulome, verursacht durch chirurgische Handschuhpuder. Schweiz-med.Wschr, 92, 1703-1708 (1962)

Lebenslauf

Ich, Kurt-Günter Ravens wurde am 20.4.1939 in Frauendorf/ Kr. Randow als Sohn des Arztes Dr. med. Curt Ravens und seiner Ehefrau Ruth Friederici geboren.
Nach regelrechter 13-jähriger Schulzeit bestand ich am 17.2.1959 am Alten Gymnasium in Flensburg das Abitur. Mit dem Sommersemester 1959 begann ich in Kiel Medizin zu studieren. Ab Wintersemester 60/61 studierte ich für drei Semester an der Universität in Tübingen. Nach einem Sommersemester in Wien war ich für die letzten vier klinischen Semester an der Freien Universität immatrikuliert. Am 8.3.1965 habe ich das medizinische Staatsexamen bestanden.
Seit dem 1.4.1965 bin ich im Pathologischen Institut der Freien Universität als Medizinalassistent tätig.